



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119421898 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 11

(21) 申请号 202380025716.4

(22) 申请日 2023.03.16

(30) 优先权数据

22162550.2 2022.03.16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/056832 2023.03.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/175117 EN 2023.09.21

(83) 生物保藏信息

DSM ACC 2856 2007.08.08

DSM ACC 2807 2006.10.05

DSM ACC 2806 2006.09.15

DSM ACC 2606 2003.08.14

(71) 申请人 芬迪沙法姆股份公司

地址 德国

(72) 发明人 J·格莱尔特 A·丹尼尔奇克

P·克莱尔 A·佳科尔

S·巴尔克 T·里斯切克

C·戈勒特兹 A·弗勒什奈

L·斯托克尔 S·古尔卡

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 陈晓娜

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书48页

序列表(电子公布)

PCT/R0/134表1页 附图12页

(54) 发明名称

抗LYPD3抗体

(57) 摘要

本发明涉及以O-糖基化依赖性方式结合LYPD3的抗LYPD3抗体。因此,所述抗体对肿瘤相关LYPD3具有特异性。本发明还提供含有所述抗LYPD3抗体的药物组合物及其在癌症治疗中的用途。

1. 一种抗体,所述抗体能够在包含寡糖结构的表位上特异性结合糖基化的人LYPD3,所述寡糖结构选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-,所述寡糖结构连接到LYPD3的丝氨酸或苏氨酸残基。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述寡糖结构连接到SEQ ID NO:137的位置234至303内的丝氨酸或苏氨酸残基。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:137的位置234至303内的一个或多个氨基酸,并且其中特别是所述表位的至少50%的氨基酸存在于SEQ ID NO:137的位置234至303内。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体,所述抗体能够特异性结合用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中任一种或两种糖基化的人LYPD3。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体,所述抗体能够特异性结合用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3。

6. 一种能够与LYPD3结合的抗体,所述抗体包含:

(i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;或

(iii) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;或

(iv) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;或

(v) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:35的

氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;或

(vi) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;或

(vii) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;或

(viii) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列;或

(ix) 根据上述(i)至(viii)项中任一项所述的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区在六个CDR序列中总共包含1、2或3个氨基酸置换。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其中:

(i) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;或

(ii) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或

(iii) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;或

(iv) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;或

(v) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;或

(vi) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或

(vii) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;或

(viii) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;或

(ix) 所述重链可变区和轻链可变区包含的氨基酸序列在其整体长度上分别与上述(i)至(viii)项中任一项所述的重链可变区序列和轻链可变区序列至少60%相同,其中所述抗体优选地为根据上述(i)至(viii)项中任一项所述的抗体的人源化版本。

8. 根据权利要求6或7所述的抗体,所述抗体还包含Fc区。

9. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体,所述抗体是根据权利要求6至8中任一项所述的抗体。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的抗体,所述抗体包含:

(i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

其中所述抗体能够特异性结合用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3。

11. 根据权利要求6至9中任一项所述的抗体,所述抗体包含:

(i) 重链可变区,其包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

轻链可变区,其包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

其中所述抗体能够特异性结合用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3。

12. 根据权利要求6和8至10中任一项所述的抗体,所述抗体是人源化抗体,其中:

(i) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID

N0:144的氨基酸序列;或

(ii)所述重链可变区包含SEQ ID N0:140的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:144的氨基酸序列;或

(iii)所述重链可变区包含SEQ ID N0:141的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:144的氨基酸序列;或

(iv)所述重链可变区包含SEQ ID N0:142的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:144的氨基酸序列;或

(v)所述重链可变区包含SEQ ID N0:142的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:143的氨基酸序列;或

(vi)所述重链可变区包含SEQ ID N0:142的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:145的氨基酸序列;或

(vii)所述重链可变区包含SEQ ID N0:142的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:146的氨基酸序列;或

(viii)所述重链可变区包含SEQ ID N0:138的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:145的氨基酸序列;或

(ix)所述重链可变区包含SEQ ID N0:140的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID N0:145的氨基酸序列。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体,所述抗体为IgG1型、IgG2型、IgG3型或IgG4型抗体,特别是IgG1型抗体。

14.一种缀合物,其包含根据权利要求1至13中任一权利要求所述的抗体,所述抗体与其它试剂缀合。

15.根据权利要求14所述的缀合物,其中所述其它试剂是细胞毒性剂、肿瘤特异性抗体或免疫检查点阻断或活化抗体。

16.根据权利要求14所述的缀合物,所述缀合物是嵌合抗原受体。

17.一种核酸,其编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或根据权利要求14至16中任一项所述的缀合物,其中所述其它试剂是与抗体融合的多肽或蛋白质。

18.一种表达盒或载体,其包含根据权利要求17所述的核酸和与所述核酸操作连接的启动子。

19.一种宿主细胞,其包含根据权利要求17所述的核酸或根据权利要求18所述的表达盒或载体。

20.根据权利要求19所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是白细胞并且包含编码根据权利要求16所述的缀合物的核酸。

21.一种组合物,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的抗体、根据权利要求14至16中任一项所述的缀合物、根据权利要求17所述的核酸、根据权利要求18所述的表达盒或载体或根据权利要求19或20所述的宿主细胞。

22.根据权利要求21所述的组合物,所述组合物是药物组合物,所述药物组合物任选地还包含选自以下各项的一种或多种组分:溶剂、稀释剂和赋形剂。

23.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体、根据权利要求14至16中任一项所述的缀合物、根据权利要求20所述的宿主细胞或根据权利要求22所述的组合物,用于医学用途。

24. 根据权利要求23所述的抗体、缀合物、宿主细胞或组合物,用于治疗以下各项的用途:癌症,青少年特发性脊柱侧弯,胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 缺乏症,鱼眼病,混合型高脂血症,瓜氨酸血症或家族性高胆固醇血症。

25. 根据权利要求24所述的抗体、缀合物、宿主细胞或组合物,其中所述癌症选自:头颈癌,结肠癌,结直肠癌,肝细胞癌,皮肤癌,宫颈癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,肾癌,食道癌,肺癌和生殖区域癌,特别是非小细胞肺癌 (NSCLC) 和鳞状细胞癌 (SCC)。

抗LYPD3抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域。特别地,提供显示以糖基化依赖性方式的强抗原结合的抗LYPD3抗体。在特定实施方案中,本发明涉及用于治疗 and 诊断用途的抗LYPD3抗体。

背景技术

[0002] 目前,抗体是医学和研究领域广泛使用的药剂。在医学上,它们在许多不同领域都有应用。例如,抗体在治疗和预防各种疾病(诸如癌症、心血管疾病、炎症性疾病、黄斑变性、移植排斥反应、多发性硬化症和病毒感染)中用作治疗剂。在这些疗法中,抗体本身可能具有治疗活性,例如通过阻断受体或信使分子,或通过募集和活化患者的免疫系统的组分,从而抑制其疾病相关功能。

[0003] 在癌症治疗中,治疗性抗体的关键特性是它们对肿瘤组织的特异性。这意味着抗体应靶向仅在癌细胞上或主要在癌细胞上且在正常组织细胞上仅以较低程度发现的表位。因此,抗体的治疗活性(例如诱导针对靶细胞的免疫应答或通过细胞毒性有效载荷破坏细胞)特异性作用于肿瘤位点。由于抗体与非肿瘤细胞的结合,在正常组织中的各自的活性可能会导致严重的副作用。因此,增加对肿瘤细胞的特异性可降低不良反应的风险,并增强预期的疗法的安全性。

[0004] 可能的癌症抗原是LYPD3 (C4.4A)。这种蛋白质是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定的高度糖基化的细胞表面蛋白,已被证明在伤口愈合过程中在迁移的角质形成细胞中上调。LYPD3首先被描述为小鼠胰腺肿瘤细胞中的转移相关细胞表面蛋白,从此,认为LYPD3在几种不同癌症中与致癌作用相关。在癌症中,认为LYPD3通过与胞外基质的相互作用特异性地参与肿瘤细胞侵袭。

[0005] LYPD3在非小细胞肺癌(NSCLC)中强烈地过表达,与其它两种最常见的NSCLC亚型(腺癌(AC)和大细胞癌(LCC))相比,LYPD3在鳞状细胞癌(SCC)亚型中优先表达。肺癌是最常被诊断出的癌症,在2012年估计有180万新病例。NSCLC占有所有肺癌的85%,SCC是第二常见的组织学亚型,占NSCLC病例的30%,这解释了为何全球每年有大约40万的死亡人数。

[0006] 在包括食管SCC(ESCC)亚型在内的头颈部的SCC(HNSCC)中也检测到LYPD3的过表达。在转录水平上,大约50%的原发性肺癌和75%的转移性肺癌表达LYPD3 mRNA,而在正常肺组织中未检测到表达。此外,LYPD3在结直肠癌和乳腺癌中表达。

[0007] 已显示LYPD3的过表达与NSCLC、结直肠癌和ESCC的恶性表型和不良预后有关,而在乳腺癌中,LYPD3的过表达与良好的预后相关。因此,LYPD3代表抗肿瘤免疫疗法的感兴趣的靶标。

[0008] 然而,在正常生理条件下,LYPD3在皮肤角质形成细胞、食管内皮细胞和胎盘细胞中表达。这可能会在癌症疗法中引起不想要的副作用,因为抗体不能区分正常组织上的LYPD3和癌症相关LYPD3。

[0009] 因此,本领域需要提供肿瘤特异性的抗LYPD3抗体。

发明内容

[0010] 本发明者已经开发出具有增强的肿瘤特异性的抗LYPD3抗体。这些抗体以O-糖基化依赖性方式与肿瘤相关LYPD3结合,以识别癌细胞的LYPD3上存在的O-聚糖结构。癌细胞的O-糖基化包含大量的短链结构,尤其是单糖、二糖和三糖,诸如Thomsen-Friedenreich抗原 (TF;Gal β 1-3GalNAc α 1-)、唾液酸化的Thomsen-Friedenreich抗原 (sTF)、Thomsen nouvelle抗原 (Tn;GalNAc α 1-)和唾液酸化的Thomsen nouvelle抗原 (Sia α 2-6GalNAc α 1-)。相反,在正常细胞中,O-糖基化涵盖更长的寡糖链。由于开发的抗体特异性地结合携带短的源自癌细胞的O-糖基化的LYPD3,因此所述抗体区分肿瘤相关LYPD3(即存在于癌细胞上的LYPD3)和正常组织细胞上的LYPD3。因此,本发明所述的抗体优先与肿瘤细胞上的LYPD3结合,并因此具有优异的癌症特异性和减少的与正常组织的结合,从而导致癌症免疫疗法中较低的不良反应风险。

[0011] 成熟的LYPD3由两个Ly-6(白细胞抗原6)/uPAR/ α -神经毒素结构域(LU结构域)组成,并通过翻译后糖基化大量地修饰,所述翻译后糖基化包括位于或接近第二LU结构域的5个N-糖基化位点和聚集在C末端富含Ser/Thr/Pro的区域中的大约15个O-连接的碳水化合物。本发明所述的抗体通过与人LYPD3序列(SEQ ID NO:137)的氨基酸234至303处(特别是在氨基酸247至297处)的C末端富含STP的区域结合,以O-糖基化依赖性方式识别LYPD3。LYPD3的O-糖基化位点位于该区域中。

[0012] 综上所述,在第一方面,本发明涉及一种抗体,该抗体能够在包含寡糖结构的表位上特异性地结合糖基化人的LYPD3,所述寡糖结构选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-,其连接到LYPD3的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0013] 在第二方面,本发明涉及一种抗LYPD3抗体,所述抗体包含:

[0014] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

[0015] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;或

[0016] (ii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

[0017] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;或

[0018] (iii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

[0019] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,所述CDR-L3具

有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;或

[0020] (iv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

[0021] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;或

[0022] (v) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

[0023] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;或

[0024] (vi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

[0025] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;或

[0026] (vii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和

[0027] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;或

[0028] (viii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

[0029] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列;或

[0030] (ix) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列,和

[0031] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列;或

[0032] (x) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列,所述CDR-

H3具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列,和

[0033] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列;或

[0034] (xi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:82的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列,和

[0035] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:84的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列;或

[0036] (xii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:89的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列,和

[0037] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列;或

[0038] (xiii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:97的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:98的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和

[0039] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:100的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:102的氨基酸序列;或

[0040] (xiv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:105的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:106的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:107的氨基酸序列,和

[0041] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:108的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:110的氨基酸序列;或

[0042] (xv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:114的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:115的氨基酸序列,和

[0043] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:116的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:118的氨基酸序列;或

[0044] (xvi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:121的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:122的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:123的氨基酸序列,和

[0045] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:124的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:125的氨基酸序列,所述CDR-L3

具有SEQ ID NO:126的氨基酸序列;或

[0046] (xvii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:129的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:130的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:131的氨基酸序列,和

[0047] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:132的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0048] 在第三方面,本发明提供编码本发明第一或第二方面所述的抗体的核酸。此外,在第四方面,提供包含本发明所述的核酸和与所述核酸操作连接的启动子的表达盒或载体,并且在第五方面,提供了包含本发明所述的核酸或表达盒或载体的宿主细胞。

[0049] 在第六方面,本发明提供一种缀合物,所述缀合物包含与其它试剂缀合的本发明第一或第二方面所述的抗体。

[0050] 在第七方面,本发明涉及包含以下各项的组合物:本发明第一或第二方面所述的抗体、本发明第三方面所述的核酸、本发明第四方面所述的表达盒或载体、本发明第五方面所述的宿主细胞或本发明第六方面所述的缀合物。

[0051] 根据第八方面,本发明提供本发明所述的抗体、核酸、表达盒或载体、宿主细胞、组合物或缀合物,以用于医学用途,特别是癌症的治疗。

[0052] 通过以下描述和所附权利要求书,本发明的其它目的、特征、优点和方面对于本领域技术人员来说将变得显而易见。然而,应该理解的是,以下描述、所附权利要求书和具体实施例(表示了本申请的优选的实施方案)仅作为说明给出。通过阅读以下内容,本领域技术人员将很容易明白本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

[0053] 定义

[0054] 如本文所用,以下表述通常旨在优选地具有如下所述的含义,除非使用它们的上下文另有指示。

[0055] 如本文所用,表述“包括(包含)”除了其字面意义外,还包括并特定指“基本上由…组成”和“由…组成”的表述。因此,表述“包含(包括)”是指其中“包含(包括)”具体列出的元素的主题不包含其它元素的实施方案,以及其中“包含(包括)”具体列出的元素的主题可以和/或确实包含其它元素的实施方案。同样,表述“具有”应理解为表述“包含(包括)”,也包括并特定指表述“基本上由…组成”和“由…组成”。术语“基本上由…组成”在可能的情况下,特别是指除了主题基本上由其组成的具体列出的元素之外,其中主题包含20%或更少、特别是15%或更少、10%或更少或尤其是5%或更少的其它元素的实施方案。

[0056] 术语“抗体”特别是指包含至少两个重链和两个轻链(通过二硫键连接)的蛋白质。每个重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)。每个轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。重链恒定区包含三个重链恒定结构域或在IgM或IgE型抗体的情况下包含四个重链恒定结构域(CH1、CH2、CH3和CH4),其中第一恒定结构域CH1与可变区相邻,并且可以通过铰链区与第二恒定结构域CH2连接。轻链恒定区仅由一个恒定结构域组成。可变区可以还细分为高变异性的区,称为互补决定区(CDR),散布着更保守的区,称为构架区(FR),其中每个可变区包含三个CDR和四个FR。特别是根据IMGT系统基于CDR定位确定CDR的氨基酸残基。

[0057] 重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。重链恒定区可以是任何

类型,诸如 γ 、 δ 、 α 、 μ 或 ϵ 型重链。优选地,抗体的重链是 γ 链。此外,轻链恒定区也可以是任何类型,诸如 κ 型或 λ 型轻链。优选地,抗体的轻链是 κ 链。术语“ γ (δ 、 α 、 μ 或 ϵ) 型重链”和“ κ (λ) 型轻链”分别指抗体重链或抗体轻链,其具有源自天然存在的重链或轻链恒定区氨基酸序列的恒定区氨基酸序列(尤其是人重链或轻链恒定区氨基酸序列)。特别地, γ 型(尤其是 $\gamma 1$ 型)重链的恒定结构域的氨基酸序列与人 γ (尤其是人 $\gamma 1$ 的同种异型之一)抗体重链的恒定结构域的氨基酸序列至少95%、尤其是至少98%相同。此外, κ 型轻链的恒定结构域的氨基酸序列与人 κ 抗体轻链的同种异型之一的恒定结构域的氨基酸序列特别是至少95%、尤其是至少98%相同。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。抗体可以是例如人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

[0058] 抗体的抗原结合部分通常是指保留与抗原特异性结合的能力的抗体的全长或一个或多个片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。抗体的结合片段的实例包括:Fab片段(由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段);F(ab)₂片段(包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,每个Fab片段与相同的抗原结合);由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;和由VH结构域组成的dAb片段。

[0059] 抗体的“Fab部分”特别是指抗体的一部分,所述一部分包含重链和轻链可变区(VH和VL)和重链和轻链恒定区的第一结构域(CH1和CL)。在抗体不包含所有这些区的情况下,术语“Fab部分”仅指抗体中存在的VH、VL、CH1和CL区。优选地,“Fab部分”是指对应于通过用木瓜蛋白酶消化天然抗体而获得的含有抗体的抗原结合活性的片段的抗体的部分。特别地,抗体的Fab部分涵盖其抗原结合位点或抗原结合能力。优选地,Fab部分至少包含抗体的V_H区。

[0060] 抗体的“Fc部分”特别是指包含重链恒定区2、3以及在适用时还包含4(CH2、CH3和CH4)的抗体部分。特别地,Fc部分包含这些区中的两个或每一个。在抗体不包含所有这些区的情况下,术语“Fc部分”仅指抗体中存在的CH2、CH3和CH4区的那些Fc部分。优选地,Fc部分包含至少抗体的CH2区。优选地,“Fc部分”是指对应于通过用木瓜蛋白酶消化天然抗体而获得的不含抗体的抗原结合活性的片段的抗体部分。特别地,抗体的Fc部分能够与Fc受体结合,并因此例如包含Fc受体结合位点或Fc受体结合能力。

[0061] 根据本发明,术语“嵌合抗体”特别是指其中恒定区源自人抗体或人抗体共有序列并且其中至少一个且优选地两个可变区源自非人抗体(例如源自啮齿动物抗体,诸如小鼠抗体)的抗体。

[0062] 根据本发明,术语“人源化抗体”特别是指包含人恒定区和氨基酸序列经修饰的可变区的非人抗体,所述修饰使得在施用于人体时降低抗体的免疫原性。用于构建人源化抗体的示例性方法是CDR移植,其中非人抗体的CDR或特异性决定残基(SDR)与源自人的构架区结合。任选地,人构架区的一些残基可以向亲本非人抗体的残基回复突变,例如用于增加或恢复抗原结合亲和力。其它人源化方法包括,例如,表面重建、超人源化和人体串含量优化(human string content optimization)。在表面重建方法中,只有位于抗体的表面的非人构架区的那些残基被存在于所述位置的相应的人抗体序列中的残基替换。超人源化基本上对应于CDR移植。然而,虽然在CDR移植过程中,通常基于人构架区与非人构架区的同源性

来选择人构架区,但在超人源化过程中,选择人构架区的基础是CDR的相似性。在人体串含量优化中,对非人抗体序列与人类种系序列的差异进行评分,然后突变抗体以最小化所述评分。此外,人源化抗体也可以通过经验方法获得,其中使用人构架区或人抗体的大型文库来产生多种抗体人源化候选物,然后通过筛选方法确定最有希望的候选物。同样通过上述合理的方法,可以产生几种人源化抗体候选物,然后,例如对它们的抗原结合进行筛选。

[0063] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有其中构架区和CDR区均源自人源序列的可变区的抗体。

[0064] 如本文所用,术语“抗体”在某些实施方案中是指相同种类的抗体的群。特别地,抗体的群中的所有抗体都表现出用于定义抗体的特征。在某些实施方案中,抗体的群中的所有抗体具有相同的氨基酸序列。提及特定种类的抗体,诸如抗LYPD3抗体,特别是指这种抗体的群。

[0065] 本文使用的术语“抗体”包括全长抗体以及所述抗体的片段和衍生物。抗体的“片段或衍生物”特别是源自所述抗体并且能够结合相同的抗原(特别是和抗体一样结合相同的表位)的蛋白质或糖蛋白。因此,本文中抗体的片段或衍生物通常是指功能性片段或衍生物。在特别优选的实施方案中,抗体的片段或衍生物包含重链可变区。已经显示,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段或其衍生物进行。抗体的片段的实例包括:(i) Fab片段(由每个重链和轻链的可变区和第一恒定结构域组成的单价片段);

[0066] (ii) $F(ab)_2$ 片段(包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段); (iii) 由重链的可变区和第一恒定结构域CH1组成的Fd片段; (iv) 由抗体的单臂的重链和轻链可变区组成的Fv片段; (v) scFv片段(由单个多肽链组成的Fv片段); (vi) 由两个共价连接在一起的Fv片段组成的 $(Fv)_2$ 片段; (vii) 重链可变结构域;和(viii) 由重链可变区和轻链可变区共价连接在一起组成的多体,其共价连接的方式使得重链和轻链可变区的缔合只能在分子间发生而不能在分子内发生。抗体的衍生物特别包括与亲本抗体一样结合相同抗原的抗体,但所述衍生物具有与其源自的亲本抗体不同的氨基酸序列。这些抗体片段和衍生物是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的。

[0067] 如果目标氨基酸序列在其整体长度上与参考氨基酸序列的相应部分具有至少75%(更优选地至少80%、至少85%、至少90%、至少93%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)的同源性或同一性,则目标氨基酸序列“源自”参考氨基酸序列或“对应于”参考氨基酸序列。“对应部分”意指,例如,目标抗体的重链可变区的构架区1(FRH1)对应于参考抗体的重链可变区的构架区1。在特别实施方案中,“源自”或“对应于”参考氨基酸序列的靶氨基酸序列在其整体长度上与参考氨基酸序列的相应部分100%同源,或特别是100%相同。氨基酸序列或核苷酸序列的“同源性”或“同一性”优选地根据本发明在参考序列的整体长度上或在与定义同源性或同一性的序列相对应的参考序列的相应部分的整体长度上确定。源自由一个或多个氨基酸序列(诸如特异性CDR序列或特异性可变区序列)定义的亲本抗体的抗体,特别是具有与亲本抗体的相应氨基酸序列至少75%、优选地至少80%、至少85%、至少90%、至少93%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%同源或相同(尤其是相同)的氨基酸序列(诸如CDR序列或可变区序列)的抗体。在某些实施方案中,源自亲本抗体(即亲本抗体的衍生物)的抗体包含与亲本抗体相同的CDR序列,但可变区的其余序列不同。

[0068] 本文使用的术语“抗体”还指多价抗体(即,具有多于两个结合位点的抗体构建体,每个所述结合位点与相同的表位结合)和多特异性抗体(即,具有与第一表位结合的一个或多个结合位点和与第二表位结合的一个或多个结合位点以及任选地甚至具有与其它表位结合的其它结合位点的抗体构建体)。

[0069] “特异性结合”优选地意指试剂(诸如抗体)与其所特异性针对的靶标(诸如表位)的结合比与另一靶标的结合更强。如果试剂以低于第二靶标解离常数(K_d)的解离常数与第一靶标结合,则与第二靶标相比,试剂与第一靶标的结合更强。优选地,试剂特异性结合的靶标的解离常数是试剂非特异性结合的靶标的解离常数的不到1/10、1/30、1/100或不到1/500。此外,术语“特异性结合”特别地表示结合配偶体之间的结合亲和力,且亲和力常数 K_a 为至少 10^5M^{-1} 、优选地至少 10^6M^{-1} 、更优选地至少 10^7M^{-1} ,例如至少 10^8M^{-1} 。对某种抗原特异的抗体特别是指能够以具有至少 10^5M^{-1} 、优选地至少 10^6M^{-1} 、更优选地至少 10^7M^{-1} 的 K_a 的亲和力与所述抗原结合的抗体。例如,术语“抗LYPD3抗体”是指特异性结合LYPD3的抗体,并且优选地能够以具有至少 10^5M^{-1} 、优选地至少 10^6M^{-1} 、更优选地至少 10^7M^{-1} 的 K_a 的亲和力结合LYPD3。本文中使用的术语“结合”特别是指特异性结合。

[0070] 本文使用的术语“表位”是指抗体的抗原上的氨基酸残基和聚糖结构,所述氨基酸残基和聚糖结构直接与抗体的氨基酸、特别是抗体的CDR的氨基酸接触,或者与其紧邻并影响抗体与其抗原的结合。

[0071] 本发明所述的术语“LYPD3”特别是指人LYPD3蛋白,尤其是成熟的人LYPD3蛋白。本文使用的LYPD3尤其是指UniProt条目095274所示的人LYPD3蛋白。LYPD3特别包含/尤其是由以下各项组成:SEQ ID NO:137的位置31至326的氨基酸序列,或在整体长度上与SEQ ID NO:137的位置31至326至少90%、尤其是至少95%相同的氨基酸序列组成。LYPD3特别是进行翻译后修饰的,并且可以携带O-糖基化、N-糖基化和/或糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。例如,LYPD3可以在对应于SEQ ID NO:137的Ser223、Ser232、Thr247、Thr248、Ser251、Thr252、Thr253、Ser254、Thr256、Thr257、Ser258、Thr259、Ser260、Thr266、Ser267、Thr268、Thr269、Thr276、Ser277、Thr279、Ser289、Thr297、Ser307和Ser309的一个或多个位置携带O-糖基化。

[0072] 术语“GalNAc α 1-”,也称为“Tn”、“Tn抗原”或“Thomsen nouvelle抗原”,是指由N-乙酰半乳糖胺基残基组成的单糖结构,所述N-乙酰半乳糖胺基残基通过 α -糖苷键连接到支撑结构,尤其是连接到蛋白质或肽的丝氨酸或苏氨酸残基。

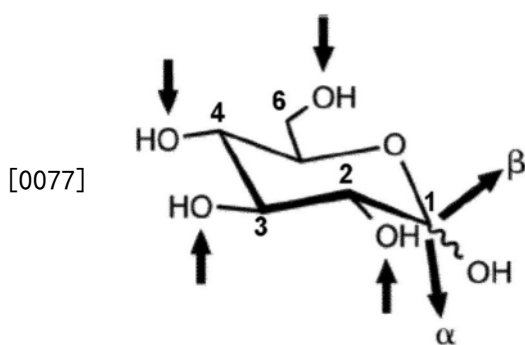
[0073] 术语“唾液酸化的GalNAc α 1-”,也称为“sTn”、“唾液酸化的Tn抗原”或“唾液酸化的Thomsen nouvelle抗原”,是指由N-乙酰半乳糖胺基残基组成的二糖结构,所述N-乙酰半乳糖胺基残基通过 α -糖苷键连接到支撑结构,尤其是蛋白质或肽的丝氨酸或苏氨酸残基。对于该结构,唾液酸残基通过 α 2-6键连接到N-乙酰半乳糖胺基残基,以产生二糖结构Sia α 2-6GalNAc α 1-。

[0074] 术语“Gal β 1-3GalNAc α 1-”,也称为“TF”、“TF抗原”、“T抗原”或“Thomsen Friedenreich抗原”,是指由通过 β 1-3键连接到N-乙酰半乳糖胺基残基的半乳糖残基组成的二糖结构,所述N-乙酰半乳糖胺基残基通过 α 1-糖苷键连接到支撑结构,尤其是连接到蛋白质或肽的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0075] 术语“唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-”,也称为“sTF”、“sTF抗原”、“唾液酸化的TF

抗原”、“唾液酸化的T抗原”或“唾液酸化的Thomsen Friedenreich抗原”,是指由通过 $\beta 1-3$ 键连接到N-乙酰半乳糖胺基残基的半乳糖残基组成的三糖或四糖结构,所述N-乙酰半乳糖胺基残基通过 $\alpha 1$ -糖苷键连接到支撑结构,尤其是连接到蛋白质或肽的丝氨酸或苏氨酸残基。对于该结构,唾液酸残基通过 $\alpha 2-3$ 键连接到半乳糖残基,和/或唾液酸残基通过 $\alpha 2-6$ 键连接到N-乙酰半乳糖胺基残基,以产生三糖结构Sia $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-3$ GalNAc $\alpha 1$ -和Gal $\beta 1-3$ (Sia $\alpha 2-6$)GalNAc $\alpha 1$ -或四糖结构Sia $\alpha 2-6$ (Sia $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-3$)GalNAc $\alpha 1$ -。

[0076] 在上述结构中,Gal代表半乳糖残基,GalNAc代表N-乙酰半乳糖胺残基。“ $\beta 1-3$ ”、“ $\alpha 2-3$ ”和“ $\alpha 2-6$ ”表示两个相邻单糖残基的连接,具体地分别是左侧单糖的碳原子C1或C2与右侧单糖的碳原子C3或C6之间的连接,其中连接可以在 α 或 β 位置(如以下葡萄糖的方案所示):



[0078] 术语“GalNAc $\alpha 1$ -”表示在寡糖的还原端的GalNAc残基通过其 α 构型的碳原子C1连接到支撑结构。

[0079] 术语“唾液酸”特别是指神经氨酸的任何N-或O-取代衍生物。其可以指5-N-乙酰神经氨酸(NeuNAc)和5-N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc),但优选地仅指5-N-乙酰神经氨酸。

[0080] 术语“聚糖”、“聚糖结构”、“碳水化合物”、“碳水化合物链”和“碳水化合物结构”通常在本文中同义使用。

[0081] 在“缀合物”中,两个或更多个化合物连接在一起。在某些实施方案中,来自每种化合物的至少一些性质保留在缀合物中。连接可以通过共价键或非共价键实现。优选地,缀合物的化合物通过共价键连接。缀合物的不同化合物可以通过化合物的原子之间的一个或多个共价键直接相互结合。备选地,化合物可以通过化学部分(诸如接头分子)彼此结合,其中接头共价连接到化合物的原子。如果缀合物由多于两个的化合物组成,则这些化合物可以例如以链构象连接(即,一个化合物连接到下一个化合物),或者几个化合物各自可以连接到一个中心化合物。

[0082] 术语“核酸”包括单链和双链核酸和核糖核酸以及脱氧核糖核酸。其可以包含天然存在的以及合成的核苷酸,并且可以通过例如甲基化、5'-和/或3'-加帽进行天然或合成修饰。

[0083] 术语“表达盒”特别是指能够实现和调控其中引入的编码核酸序列的表达的核酸构建体。表达盒可以包含启动子、核糖体结合位点、增强子和其它调控基因的转录或mRNA的翻译的控制元件。表达盒的确切结构可能随物种或细胞类型而变化,但通常包含分别参与转录和翻译的起始的5'-非转录序列和5'-和3'-非翻译序列,诸如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。更特定地,5'-非转录的表达控制序列包含启动子区,所述启动子区包括用于操作

性连接的核酸的转录控制的启动子序列。表达盒还可以包含增强子序列或上游激活因子序列。

[0084] 根据本发明,术语“启动子”是指位于待表达的核酸序列的上游(5')的核酸序列,并通过提供RNA聚合酶的识别和结合位点来控制序列的表达。“启动子”可以包含其它因子的另外的识别和结合位点,所述其它因子参与基因转录的调控。启动子可以控制原核或真核基因的转录。此外,启动子可以是“诱导型的”,即响应于诱导剂启动转录,或者如果转录不受诱导剂控制,则启动子可以是“组成型”的。如果不存在诱导剂,则受诱导型启动子控制的基因不表达或仅少量表达。在诱导剂的存在下,基因被启动或转录水平增加。通常,这是通过结合特定的转录因子来介导的。

[0085] 术语“载体”在这里以其最一般的含义使用,并且包含核酸的任何中间载体,所述中间载体使得所述核酸例如能够被引入原核和/或真核细胞并且在适当的情况下被整合到基因组中。这种载体优选地在细胞中复制和/或表达。载体包含质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒基因组。本文使用的术语“质粒”通常涉及染色体外遗传物质的构建体(通常是环状DNA双链体),其可以独立于染色体DNA复制。

[0086] 根据本发明,术语“宿主细胞”涉及可以用外源核酸转化或转染的任何细胞。根据本发明,术语“宿主细胞”包含原核细胞(例如大肠杆菌(E.coli))或真核细胞(例如哺乳动物细胞,特别是人或仓鼠细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。特别优选哺乳动物细胞,诸如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊或灵长类动物的细胞。细胞可以源自多种组织类型,并包含原代细胞和细胞系。核酸可以单拷贝或双拷贝或更多拷贝的形式存在于宿主细胞中,并且在一个实施方案中,所述核酸在宿主细胞中表达。

[0087] 本发明所述的术语“患者”是指人类、非人灵长类动物或其它动物,特别是哺乳动物,诸如牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物,诸如小鼠和大鼠。在特别优选的实施方案中,患者是人类。

[0088] 本发明所述的术语“癌症”特别包含白血病、精原细胞瘤、黑素瘤、畸胎瘤、淋巴瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血癌、皮肤癌、脑癌、宫颈癌、肠癌(intestinal cancer)、肝癌、结肠癌、胃癌、大肠癌(intestine cancer)、头颈癌、胃肠道癌、淋巴结癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、耳鼻喉(NET)癌、膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌及其转移。本发明所述的术语癌症还包含癌症转移。术语癌症还指和/或包括癌症干细胞,尤其是上述列出的特定类型癌症的癌症干细胞。

[0089] “肿瘤”意指由失调的细胞增殖形成的一组细胞或组织。肿瘤可能表现出部分或完全缺乏结构组织和与正常组织的功能协调,并且经常形成明显的组织块,其可能是良性或恶性的。

[0090] “转移”意指癌细胞从其原始部位扩散到身体的另一部分。转移的形成是一个非常复杂的过程,通常涉及癌细胞从原发肿瘤中脱离出来,进入身体循环并安定下来在身体其它地方的正常组织中生长。当肿瘤细胞转移时,新肿瘤被称为继发性或转移性肿瘤,并且其细胞通常类似于原始肿瘤中的细胞。这意味着,例如,如果乳腺癌转移到肺部,继发性肿瘤由异常的乳腺细胞组成,而不是由异常的肺细胞组成。肺部的肿瘤被称为转移性乳腺癌,而不是肺癌。

[0091] 术语“药物组合物”特别是指适合给人或动物施用的组合物,即含有药学上可接受

的组分的组合物。优选地,药物组合物包含活性化合物或其盐或前药以及运载体、稀释剂或药物赋形剂(诸如缓冲剂、防腐剂和张力调节剂)。

具体实施方式

[0092] 本发明基于特异性结合肿瘤相关LYPD3的抗LYPD3抗体的开发。这些抗体是使用携带癌细胞产生的O-聚糖结构的LYPD3或LYPD3片段并选择那些以O-糖基化依赖性方式与LYPD3结合的抗体而产生的。正常细胞产生的O-糖基化与癌细胞产生的O-糖基化显著不同。例如,正常细胞产生大的O-聚糖结构,而肿瘤细胞上的LYPD3主要携带单糖、二糖和三糖,诸如GalNAc α 1-(Tn)、唾液酸化的GalNAc α 1-(sTn)、Gal β 1-3GalNAc α 1-(TF)和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-(sTF)。本发明所述的抗体识别并结合肿瘤相关LYPD3的这些小的O-聚糖结构。因此,这些抗体以比针对正常组织的LYPD3更高的亲和力与肿瘤细胞上的LYPD3结合,并且能够区分肿瘤相关和非肿瘤相关LYPD3。

[0093] 1. 抗LYPD3抗体

[0094] 鉴于这些发现,本发明在第一方面提供一种抗体,所述抗体能够在包含寡糖结构的表位上特异性结合糖基化的人LYPD3,所述寡糖结构选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-,所述寡糖结构连接到LYPD3的丝氨酸或苏氨酸残基。优选地,该抗体能够在包含一种或多种GalNAc α 1-和/或Gal β 1-3GalNAc α 1-寡糖结构的表位上特异性结合糖基化的人LYPD3,所述寡糖结构连接到LYPD3的丝氨酸和/或苏氨酸残基。

[0095] 与非糖基化的人LYPD3相比,能够特异性结合糖基化的人LYPD3的抗体以更高的结合亲和力结合糖基化的人LYPD3。在某些实施方案中,与携带相同聚糖结构的不相关的蛋白质相比,能够特异性结合糖基化的人LYPD3的抗体以更高的结合亲和力与糖基化的人LYPD3结合。本文中使用的术语“更高的结合亲和力”特别是指解离常数的差异为至少10倍,尤其是至少25倍,特别是至少100倍。

[0096] 在某些实施方案中,抗体能够在包含多于一种寡糖结构(例如2、3或4种寡糖结构)的表位上与人LYPD3结合,所述寡糖结构连接到LYPD3的丝氨酸和/或苏氨酸残基。这些其它寡糖结构中的一种或多种也可以选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-。在特定实施方案中,该抗体能够在包含两个寡糖结构的表位上与人LYPD3结合,每个寡糖结构选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-,并且每个寡糖结构都连接到LYPD3的丝氨酸或苏氨酸残基。尤其是,该抗体能够在包含三个寡糖结构的表位上与人LYPD3结合,每个寡糖结构选自:GalNAc α 1-,唾液酸化的GalNAc α 1-,Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-,并且每个寡糖结构都连接到LYPD3的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0097] 一种或多种寡糖结构特别存在于LYPD3的C末端富含Ser/Thr/Pro的结构域中。在某些实施方案中,至少一种并且尤其是所有寡糖结构连接到SEQ ID NO:137的位置234至303内的丝氨酸或苏氨酸残基。特别地,至少一种并且尤其是所有寡糖结构都连接到SEQ ID NO:137的位置247至297内的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0098] 抗体能够在结合的肽和碳水化合物表位上与人LYPD3结合。例如,表位包含SEQ ID NO:137的位置234至303内的一个或多个氨基酸。特别地,表位包含SEQ ID NO:137的位置

247至297内的一个或多个氨基酸。在特定实施方案中,表位的至少25%、尤其是至少50%、特别是至少75%的氨基酸存在于SEQ ID NO:137的位置234至303内,特别是在SEQ ID NO:137的位置247至297内。优选地,表位的所有氨基酸都存在于SEQ ID NO:137的位置234至303内。

[0099] 在这方面,术语“能够在结合的肽和碳水化合物表位上与人LYPD3结合”意指抗体要么直接与LYPD3的氨基酸和一个或多个聚糖结构相互作用,要么仅与LYPD3的氨基酸直接相互作用,要么仅与LYPD3的碳水化合物链直接相互作用。在所有情况下,与非糖基化的LYPD3相比,如果从由GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-组成的组中选择的寡糖结构连接到LYPD3的氨基酸,则抗体对LYPD3的结合亲和力更高。在抗体仅与LYPD3的氨基酸直接相互作用而不与碳水化合物链直接相互作用的实施方案中,针对O-糖基化的LYPD3的更高的亲和力是基于由连接到LYPD3的寡糖诱导的多肽链的构象变化。

[0100] 在某些实施方案中,抗体特异性结合肿瘤相关LYPD3。与从由GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-组成的组中选择的寡糖结构且所述寡糖结构连接到与LYPD3不相关的运载体分子相比,该抗体尤其以更高的结合亲和力与糖基化的人LYPD3结合。例如,运载体分子可以是聚丙烯酰胺(PAA)或随机的肽。在某些实施方案中,抗体能够以比针对正常组织的细胞表达的LYPD3更高的结合亲和力结合肿瘤相关LYPD3。

[0101] 在特定实施方案中,该抗体能够与用GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中任一种或多种糖基化的人LYPD3结合。因此,如果LYPD3被GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-、唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-或这些聚糖结构的中两种或全部的任何混合物糖基化,则该抗体与LYPD3结合。在这些实施方案中,只要还存在上述聚糖结构中的至少一种,则LYPD3也可以携带其它聚糖结构。特别地,这些抗体与用GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或多种糖基化的人LYPD3特异性结合。

[0102] 在特定实施方案中,抗体能够与用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3结合。因此,如果LYPD3被GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-或这两种聚糖结构的任何混合物糖基化,则该抗体与LYPD3结合。在这些实施方案中,只要还存在上述聚糖结构中的至少一种,则LYPD3也可以携带其它聚糖结构。特别地,这些抗体特异性结合用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3。

[0103] 在特定实施方案中,该抗体能够与用Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3结合。因此,如果LYPD3被Gal β 1-3GalNAc α 1-、唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-或这两种聚糖结构的任何混合物糖基化,则该抗体与LYPD3结合。在这些实施方案中,只要还存在上述聚糖结构中的至少一种,则LYPD3也可以携带其它聚糖结构。特别地,这些抗体特异性结合用Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3。

[0104] 在特定实施方案中,抗体能够与用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3结合。因此,如果LYPD3被Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化,则该抗体与LYPD3结合。在这些实施方案中,只要还存在Gal β 1-3GalNAc α 1-,则LYPD3也可以携带其它聚糖结构。特别地,这些抗体特异性

结合用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3。

[0105] 在第二方面,本发明提供一种抗LYPD3抗体,所述抗体包含:

[0106] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

[0107] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;或

[0108] (ii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

[0109] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;或

[0110] (iii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

[0111] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;或

[0112] (iv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

[0113] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;或

[0114] (v) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

[0115] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;或

[0116] (vi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

[0117] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;或

[0118] (vii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-

H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和

[0119] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;或

[0120] (viii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

[0121] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列;或

[0122] (ix) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列,和

[0123] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列;或

[0124] (x) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列,和

[0125] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列;或

[0126] (xi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:82的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列,和

[0127] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:84的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列;或

[0128] (xii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:89的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列,和

[0129] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列;或

[0130] (xiii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:97的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:98的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和

[0131] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有

SEQ ID NO:100的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:102的氨基酸序列;或

[0132] (xiv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:105的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:106的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:107的氨基酸序列,和

[0133] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:108的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:110的氨基酸序列;或

[0134] (xv) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:114的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:115的氨基酸序列,和

[0135] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:116的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:118的氨基酸序列;或

[0136] (xvi) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:121的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:122的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:123的氨基酸序列,和

[0137] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:124的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:125的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:126的氨基酸序列;或

[0138] (xvii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:129的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:130的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:131的氨基酸序列,和

[0139] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:132的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0140] 在某些实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(i)至(viii)项中任一项所述的重链可变区和轻链可变区。在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(ii)项所述的重链可变区和轻链可变区。在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(v)项所述的重链可变区和轻链可变区。

[0141] 在特定实施方案中,抗LYPD3抗体在六个CDR序列中总共可以具有1、2或3个氨基酸置换,特别是1或2个、尤其是1个氨基酸置换。在这些实施方案中,抗LYPD3抗体保留没有所述氨基酸置换的抗体的抗原特异性。本文使用的“氨基酸置换”还包括氨基酸添加和氨基酸缺失。在某些实施方案中,氨基酸置换是保守的氨基酸置换。

[0142] 本发明第二方面所述的抗体特别表现出为第一方面所述的抗体所定义的一种或多种结合活性。特别地,第二方面所述的抗体是第一方面所述的抗体。

[0143] 在某些实施方案中,本发明所述的抗体包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0144] (i) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少60%相

同的氨基酸序列,并且包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

[0145] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0146] (ii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

[0147] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0148] (iii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

[0149] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

[0150] (iv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

[0151] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:32的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;

[0152] (v) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

[0153] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

[0154] (vi) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

[0155] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;

[0156] (vii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和

[0157] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:56的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;和

[0158] (viii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

[0159] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0160] 在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(ii)项所述的重链可变区和轻链可变区。在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(v)项所述的重链可变区和轻链可变区。在上述实施方案中,序列同一性可以特别是至少70%,优选地至少80%,和更优选地至少90%。上述实施方案特别是相应抗体的人源化版本,其中氨基酸序列的变化是对相关人抗体序列的氨基酸残基的置换。

[0161] 在某些实施方案中,抗LYPD3抗体在六个CDR序列中可以额外地总共具有1、2或3个氨基酸置换,特别是1或2个、尤其是1个氨基酸置换。在这些实施方案中,抗LYPD3抗体保留没有所述氨基酸置换的抗体的抗原特异性。

[0162] 在进一步的实施方案中,本发明所述的抗体包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0163] (ix) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:71的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列,和

[0164] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:72的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列;

[0165] (x) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列,和

[0166] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少90%相同

的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列;

[0167] (xi) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:87的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:82的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列,和

[0168] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:88的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:84的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列;

[0169] (xii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:89的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列,和

[0170] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:96的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

[0171] (xiii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:103的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:97的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:98的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和

[0172] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:104的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:100的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:101的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:102的氨基酸序列;

[0173] (xiv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:111的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:105的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:106的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:107的氨基酸序列,和

[0174] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:112的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:108的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:110的氨基酸序列;

[0175] (xv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:119的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:114的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:115的氨基酸序列,和

[0176] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:120的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:116的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:118的氨基酸

序列;

[0177] (xvi) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:127的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:121的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:122的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:123的氨基酸序列,和

[0178] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:128的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:124的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:125的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:126的氨基酸序列;和

[0179] (xvii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:135的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:129的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:130的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:131的氨基酸序列,和

[0180] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:136的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:132的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0181] 在上述实施方案中,序列同一性可以特别是至少95%。在某些实施方案中,抗LYPD3抗体在六个CDR序列中可以额外地总共具有1、2或3个氨基酸置换,特别是1或2个、尤其是1个氨基酸置换。在这些实施方案中,抗LYPD3抗体保留没有所述氨基酸置换的抗体的抗原特异性。

[0182] 特别地,本发明所述的抗体包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0183] (i) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区;

[0184] (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;

[0185] (iii) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区;

[0186] (iv) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区;

[0187] (v) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区;

[0188] (vi) 包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的轻链可变区;

[0189] (vii) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的轻链可变区;

[0190] (viii) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的轻链可变区。

[0191] 在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(ii)项所述的重链可变区和轻

链可变区。在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体包含根据上述(v)项所述的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中,抗体是根据上述(i)至(viii)项中任一项所述的抗体的人源化版本。人源化版本特别地在原始序列的整体长度上具有与上述抗体至少60%、尤其是至少70%、优选地至少80%、更优选地至少90%的氨基酸序列同一性。在某些实施方案中,本发明所述的抗体是人源化抗体,所述人源化抗体源自具有包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区的抗体,或源自具有包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0192] 特别地,本发明所述的抗体是人源化抗体,所述人源化抗体包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0193] (i) 包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0194] (ii) 包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0195] (iii) 包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0196] (iv) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0197] (v) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区;

[0198] (vi) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区;

[0199] (vii) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的轻链可变区;

[0200] (viii) 包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0201] (ix) 包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区。

[0202] 本发明所述的抗体还可以包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0203] (ix) 包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链可变区;

[0204] (x) 包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的轻链可变区;

[0205] (xi) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的轻链可变区;

[0206] (xii) 包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的轻链可变区;

[0207] (xiii) 包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的轻链可变区;

[0208] (xiv) 包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的轻链可变区;

[0209] (xv) 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的轻链可变区;

[0210] (xvi) 包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0211] (xvii) 包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的轻链可变区。

[0212] 在实施方案中,其中重链和/或轻链可变区包含与SEQ ID NO:7、8、15、16、23、24、31、32、39、40、47、48、55、56、63、64、71、72、79、80、87、88、95、96、103、104、111、112、119、120、127、128、135或136的氨基酸序列具有一定同一性的氨基酸序列,与所述氨基酸序列的任何序列偏差特别位于构架区中,但不位于CDR中。因此,在这些实施方案中,重链和轻链可变区包含如本文所定义的各自的CDR序列。

[0213] 在特定实施方案中,抗体能够与用GalNAc α 1-、唾液酸化的GalNAc α 1-、Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或多种糖基化的人LYPD3结合,并包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0214] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

[0215] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0216] (ii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和

[0217] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

[0218] (iii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,和

[0219] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0220] (iv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:51的氨基酸序

列,和

[0221] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:56的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

[0222] (v) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0223] (vi) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的轻链可变区。

[0224] 在特定实施方案中,抗体能够与用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3结合,并包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0225] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

[0226] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

[0227] (ii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

[0228] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;

[0229] (iii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

[0230] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列;

[0231] (iv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列,和

[0232] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

[0233] (v) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列,和

[0234] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列;

[0235] (vi) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和

[0236] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列;

[0237] (vii) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区;

[0238] (viii) 包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0239] (ix) 包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0240] (x) 包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0241] (xi) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的轻链可变区;

[0242] (xi) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区;

[0243] (xii) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区;

[0244] (xiii) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的轻链可变区;

[0245] (xiv) 包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区;

[0246] (xv) 包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链可变区;

[0247] (xvi) 包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0248] (xvii) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的轻链可变区。

[0249] 在优选的实施方案中,抗体能够与用GalNAc α 1-和Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3结合,并且包含根据上述(i)、(iv)、(vii)和(viii)至(xv)项中任一项所述的重链可变区和轻链可变区。

[0250] 在特定实施方案中,抗体能够与用Gal β 1-3GalNAc α 1-和唾液酸化的Gal β 1-3GalNAc α 1-中的任一种或两种糖基化的人LYPD3结合,并包含选自以下各项的重链可变区

和轻链可变区：

[0251] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

[0252] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;

[0253] (ii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和

[0254] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:32的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列;和

[0255] (iii) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区。

[0256] 在特定实施方案中,抗体能够与用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3结合,并包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区:

[0257] (i) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

[0258] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0259] (ii) 重链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,所述CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,所述CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

[0260] 轻链可变区,其包含互补决定区(CDR):CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,所述CDR-L3具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

[0261] (iii) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和

[0262] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0263] (iv) 重链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述CDR-H1具有SEQ ID NO:17的氨

氨基酸序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和

[0264] 轻链可变区,其具有在其整体长度上与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少60%相同的氨基酸序列,并且包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述CDR-L1具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,CDR-L3具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

[0265] (v) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0266] (vi) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[0267] 在优选的实施方案中,抗体能够与用Gal β 1-3GalNAc α 1-糖基化的人LYPD3结合,并且包含根据上述(i)、(iii)和(v)项中任一项所述的重链可变区和轻链可变区。

[0268] 在上述实施方案中,序列同一性可以特别是至少70%、优选地至少80%、和更优选地至少90%。在涉及序列同一性的上述实施方案中,抗体特别是相应抗体的人源化版本,其中氨基酸序列的变化是对相关的人抗体序列的氨基酸残基的置换。

[0269] 在某些实施方案中,抗LYPD3抗体在六个CDR序列中可以额外地总共具有1、2或3个氨基酸置换,特别是1或2个、尤其是1个氨基酸置换。在这些实施方案中,抗LYPD3抗体保留没有所述氨基酸置换的抗体的抗原特异性。

[0270] 在某些实施方案中,抗体包含Fc区。抗体可以尤其是完整的抗体。特别地,抗体可以包含两个重链和两个轻链。抗体可以是任何同种型,并且特别是IgG型抗体,尤其是IgG1、IgG2或IgG4。在特定实施方案中,抗体是IgG1型抗体。抗体特别能够结合一个或多个人Fc受体,尤其是人Fc γ 受体诸如Fc γ 受体IIIa。在某些实施方案中,抗LYPD3抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0271] 在进一步的实施方案中,抗LYPD3抗体是抗体的片段。尤其是,片段选自:(i) Fab片段;(ii) F(ab) $_2$ 片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) scFv片段;和(vi) (Fv) $_2$ 片段。在某些实施方案中,抗LYPD3抗体不包含Fc区。

[0272] 在某些实施方案中,抗LYPD3抗体被糖基化,尤其是被N-糖基化。特别地,抗体在重链的第二恒定结构域(CH2)中具有糖基化位点。抗体通常具有两个具有相同氨基酸序列的重链。因此,抗体优选地具有至少两个糖基化位点,其两个CH2结构域中的每一个中都有一个糖基化位点。根据Kabat编号,该糖基化位点特别地在对应于重链氨基酸位置297的氨基酸位置,并且具有氨基酸序列基序Asn Xaa Ser/Thr,其中Xaa可以是脯氨酸以外的任何氨基酸。在Asn297的N-连接的糖基化在哺乳动物IgG以及其它抗体同种型的同源区中是保守的。由于可变区中可能存在任选的额外的氨基酸或其它序列修饰,因此该保守的糖基化位点的实际位置可能在抗体的氨基酸序列中不同。

[0273] 在优选的实施方案中,抗LYPD3抗体不包含N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc)或可检测量的NeuGc。此外,抗体优选地也不包含Galili表位(Gal α 1,3-Gal结构)或可检测量的Galili表位。特别地,携带NeuGc和/或Gal α 1,3-Gal结构的聚糖的相对量小于抗体群中连接至抗体Fc部分的聚糖总量的0.1%或甚至小于0.02%。

[0274] 在其它实施方案中,抗LYPD3抗体在其CH2结构域处没有被糖基化。在这些实施方案中,抗体的CH2结构域可以突变,例如通过用任何其它氨基酸(例如丙氨酸或谷氨酰胺)置

换重链的位置297(或相应位置)的天冬酰胺残基。在CH2结构域缺乏糖基化的抗体与Fc γ 受体的结合减少,并因此具有降低的效应物功能。在进一步的实施方案中,抗LYPD3抗体可以具有减少Fc受体结合的其它或额外的氨基酸置换,所述氨基酸置换包含例如Leu235Glu(“LE突变”)、Leu234Ala/Leu235Ala(“LALA”突变)、Ser228Pro/Leu235Glu(“SPLE”突变)、Leu234Ala/Leu235Ala/Pro329Gly(“LALA-PG”突变)及其组合。

[0275] 本发明还提供一种抗LYPD3抗体,其与如本文所述的抗体、尤其是与本发明第二方面所述的抗体竞争结合LYPD3。在某些实施方案中,竞争性抗LYPD3抗体与包含选自以下各项的重链可变区和轻链可变区的抗体竞争:

[0276] (i) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区;

[0277] (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;

[0278] (iii) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区;

[0279] (iv) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区;

[0280] (v) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区;

[0281] (vi) 包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的轻链可变区;

[0282] (vii) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0283] (viii) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的轻链可变区。

[0284] 用于确定两个抗体的竞争性结合的测定在本领域是众所周知的。例如,可以使用ELISA,其中固定LYPD3并且标记第一抗体并向固定的LYPD3添加过量的第二抗体。如果洗涤后可以用固定的LYPD3在样品中检测到标记,则未观察到竞争性结合。在优选的实施方案中,进行对照实验,其中标记第二抗体并且过量添加第一抗体。备选地,也可以固定其中一种抗体,并且可以标记LYPD3并添加过量的另一种抗体。

[0285] 2. 抗LYPD3抗体的产生

[0286] 抗LYPD3抗体优选地在宿主细胞中重组地产生。因此,该抗体特别是单克隆抗体。用于产生抗体的宿主细胞可以是可用于抗体产生的任何宿主细胞。合适的宿主细胞特别是真核宿主细胞,尤其是哺乳动物宿主细胞。示例性宿主细胞包括酵母细胞诸如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞系、昆虫细胞诸如SF9和SF21细胞系、植物细胞、鸟类细胞诸如EB66鸭细胞系、啮齿动物细胞诸如CHO、NS0、SP2/0和YB2/0细胞系,和人细胞诸如HEK293、PER.C6、CAP、CAP-T、AGE1.HN、Mutz-3和KG1细胞系。

[0287] 在某些实施方案中,抗LYPD3抗体在人细胞系中重组地产生,特别是在人髓系白血病细胞系中重组地产生。WO 2008/028686 A2中描述了可用于生产抗LYPD3抗体的优选的人细胞系以及合适的产生程序。在特定实施方案中,通过在选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6和NM-

H9D8-E6Q12的人髓系白血病细胞系中表达来获得抗LYPD3抗体。根据《布达佩斯条约》的要求,这些细胞系由Glycotope GmbH(Robert-Rössle-Str.101325Berlin(德国))以登记号DSMACC2806(NM-H9D8;2006年9月15日保藏)、DSMACC2807(NM-H9D8-E6;2006年10月5日保藏)和DSM ACC2856(NM-H9D8-E6Q12;2007年8月8日保藏)保藏于德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ),Inhoffenstraße 7B,38124Braunschweig(德国))。NM-H9D8细胞提供具有高度唾液酸化、高度二等分GlycNAc、高度半乳糖基化和高度岩藻糖基化的糖基化模式。NM-H9D8-E6和NM-H9D8-E6Q12细胞提供类似于NM-H9D8细胞的糖基化模式,不同在于岩藻糖基化程度很低。其它合适的细胞系包括K562(一种保藏于美国典型培养物保藏中心的人髓系白血病细胞系(ATCC CCL-243))、CHO细胞以及源自上述细胞的细胞系。在特定实施方案中,抗LYPD3抗体在CHO细胞中、尤其是在CHO dhfr⁻细胞中重组地产生。

[0288] 3. 抗LYPD3抗体的缀合物

[0289] 在特定实施方案中,抗LYPD3抗体作为缀合物提供,所述缀合物包含与其它试剂缀合的抗体,所述试剂诸如可检测的标志物或治疗活性物质。抗体可以与一种或多种其它试剂缀合。如果缀合物中存在不止一种其它试剂,则这些其它试剂可以是相同的或不同的,并且特别是所有试剂都是相同的。可以使用本领域已知的任何方法实现其它试剂与抗体的缀合。其它试剂可以共价连接至抗体,特别是通过融合或化学偶联连接,或者非共价连接至抗体。在某些实施方案中,其它试剂共价(尤其是通过接头部分)连接至抗体。接头部分可以是适合于将其它试剂连接到抗体上的任何化学实体。

[0290] 其它试剂优选地用于疾病(特别是癌症)的治疗、诊断、预后和/或监测。例如,其它试剂可以选自:放射性核素,化学治疗剂,抗体,双特异性抗体或抗体片段,特别是与抗LYPD3抗体不同物种的和/或不同特异性的那些,酶,相互作用结构域,可检测标记,毒素,细胞溶解组分,免疫调节剂,免疫效应物,细胞因子,趋化因子,MHC I类或II类抗原和脂质体。

[0291] 在某些实施方案中,其它试剂是多肽或蛋白质。该多肽或蛋白质可以特别是与抗LYPD3抗体的多肽链融合。在某些实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂与抗LYPD3抗体的抗体轻链的C末端融合。在其中抗LYPD3抗体包含两个抗体轻链的实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂可以与两个抗体轻链中的每一个的C末端融合。在其它实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂与抗LYPD3抗体的抗体重链的C末端融合。在其中抗体包含两个抗体重链的实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂可以与两个抗体重链中的每一个的C末端融合。其它试剂可以相同或不同,特别是具有相同的氨基酸序列。在其中抗体不包含一个或多个轻链和一个或多个重链的实施方案中,例如在抗体是抗体片段的情况下,可以将作为多肽或蛋白质的其它试剂融合到抗体的多肽链的C末端或N末端。作为多肽或蛋白质的此类其它试剂的实例可以选自:细胞因子,趋化因子,抗体,抗原结合片段,酶和相互作用结构域。

[0292] 在某些实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂是阻断和/或触发活化信号的检查点抗体。各自的靶标的实例包括以下各项:CD40,CD3,CD137(4-1BB),OX40,GITR,CD27,CD278(ICOS),CD154(CD40配体),CD270(HVEM)和CD258(LIGHT),它们作为活化靶标;CTLA4,PD1,CD80,CD244,A2AR,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),BTLA,IDO,KIR,LAG3,TIM-3,VISTA和磷脂酰丝氨酸,它们作为抑制靶标,和它们各自的配体诸如PDL1。在其它实施方案中,作为

多肽或蛋白质的其它试剂是针对肿瘤相关抗原的抗癌抗体。下面关于联合疗法描述了可以用作融合配偶体的示例性的合适的肿瘤靶标和抗癌抗体。

[0293] 在进一步的实施方案中,作为多肽或蛋白质的其它试剂是免疫调节化合物,诸如趋化因子、细胞因子或生长因子。在这方面合适的细胞因子包括干扰素诸如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ,和白细胞介素诸如IL-15。合适的生长因子包括G-CSF和GM-CSF。

[0294] 包含与其它试剂缀合的抗LYPD3抗体的缀合物是嵌合抗原受体(CAR)。这种缀合物在本文中也称为抗LYPD3 CAR。

[0295] 在这些实施方案中,其它试剂是抗原受体,尤其是T细胞受体或T细胞共受体,或其部分和/或嵌合体。特别地,抗LYPD3抗体与跨膜结构域和胞内T细胞信号传导结构域融合,以形成嵌合抗原受体(CAR)。胞内结构域特别源自一个或多个T细胞受体或共受体。任选地,CAR还包含抗体和跨膜结构域之间的铰链区。

[0296] 在这些实施方案中,抗LYPD3抗体特别是单链抗体片段,所述单链抗体片段包含在一个多肽链中的重链可变区和轻链可变区,尤其是scFv片段。铰链区可以例如基于免疫球蛋白超家族的成员的铰链区或近膜端区。示例性铰链区包括源自IgG、CD8和CD28的铰链区。跨膜结构域可以是跨细胞膜的疏水性 α 螺旋。例如,其源自CD28。胞内T细胞信号传导结构域特别包含T细胞受体的 ζ 链的细胞质结构域。另外,胞内T细胞信号传导结构域可以包含T细胞的共刺激蛋白的其它结构域。示例性的其它结构域包含来自CD28、CD27、CD134 (OX40) 和CD137 (4-1BB) 的信号传导结构域。

[0297] 示例性CAR从N末端到C末端可以包含:(i) scFv片段的形式的抗LYPD3抗体,(ii) 源自CD8的胞外铰链区,(iii) 源自CD28的跨膜结构域,(iv) 源自CD28的细胞质信号传导结构域,和(v) 源自T细胞受体 ζ 链的信号传导结构域。

[0298] 备选地,抗LYPD3抗体、尤其是单链形式的抗体诸如scFv,可以在N末端与T细胞受体复合物的CD3链、尤其是CD3 ϵ 链融合,以形成嵌合抗原受体。或者抗LYPD3抗体、尤其是单链形式诸如scFv,可以与能够特异性结合T细胞或NK细胞上天然存在或工程化改造的受体的结合结构域融合。

[0299] 在某些实施方案中,其它试剂是细胞毒性剂或化学治疗剂,尤其是细胞毒素。可以作为其它试剂缀合的化学治疗剂的特定实例包括烷化剂诸如顺铂、抗代谢物、植物生物碱和萜类化合物、长春花生物碱、鬼臼毒素、紫杉烷诸如紫杉醇、拓扑异构酶抑制剂诸如伊立替康和托泊替康、抗肿瘤药物诸如阿霉素或微管抑制剂诸如奥瑞他汀类(auristatins) 和美登素/美登素类化合物(maytansinoids)。

[0300] 化学治疗剂可以特别选自:V-ATP酶抑制剂,促凋亡剂,Bcl2抑制剂,MCL1抑制剂,HSP90抑制剂,IAP抑制剂,mTor抑制剂,微管稳定剂,微管去稳定剂,奥瑞他汀,多拉司他汀(dolastatin),美登素,美登素类化合物,鹅膏毒素,甲硫氨酸氨肽酶,蛋白质CRM1核输出抑制剂,DPPIV抑制剂,蛋白酶体抑制剂,线粒体磷酸转移反应抑制剂,蛋白质合成抑制剂,激酶抑制剂,CDK2抑制剂,CDK9抑制剂,驱动蛋白抑制剂,HDAC抑制剂,拓扑异构酶I抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷化剂,DNA嵌入剂,DNA小沟结合物,DHFR抑制剂,微管形成抑制剂,微管蛋白的稳定剂,肌动蛋白的稳定剂,拓扑异构酶II抑制剂,铂化合物,核糖体抑制剂,RNA聚合酶II抑制剂和细菌毒素。在特定实施方案中,连接到抗LYPD3抗体的化学治疗剂选自:奥瑞他汀,美登素类化合物,拓扑异构酶I抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷化剂和DNA小沟结合物。

[0301] 在化学治疗剂的一些实施方案中,所述化学治疗剂是美登素或美登素类化合物。可用于缀合的美登素类化合物的特定实例包括以下各项:美登素醇, $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1), $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)和 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。特别地,DM1或DM4连接至抗LYPD3抗体。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是奥瑞他汀,特别是单甲基奥瑞他汀F(MMAF)、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或奥瑞他汀T。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是DNA小沟结合物,特别是吡咯并苯并二氮草(PBD)、吡咯并苯并二氮草二聚体(PBD二聚体)、倍癌霉素、倍癌霉素-羟基苯甲酰胺-氮杂吡啶(DUBA)、seco-倍癌霉素-羟基苯甲酰胺-氮杂吡啶(seco-DUBA)或阿霉素。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是DNA烷化剂,特别是吡啶并苯并二氮草或嘧啶并苯并二氮草。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是DNA损伤剂,特别是卡里奇霉素。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是拓扑异构酶I抑制剂,特别是喜树碱及其衍生物,诸如7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)、(S)-9-二甲氨基甲基-10-羟基喜树碱(托泊替康)、(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[去]吡喃并[3',4':6,7]吡啶啉[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(Exatecan(DX-8951f))和DXd。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是微管形成的抑制剂,特别是微管溶酶、安丝菌素、鬼臼毒素或长春花碱。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是微管蛋白的稳定剂,特别是紫杉醇或埃坡霉素。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是肌动蛋白的稳定剂,特别是鬼笔毒素。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是拓扑异构酶II抑制剂,特别是替尼泊甙、XK469、雷佐生、安丫啶、伊达比星或mebarone。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是铂化合物,特别是顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂(phenanthriplatin)、皮考铂(picoplatin)或沙曲铂(satraplatin)。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是核糖体抑制剂,特别是蓖麻毒素、皂草素、相思子毒素、白喉毒素或外毒素A。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是RNA聚合酶II抑制剂,特别是鹅膏蕈素,诸如例如鹅膏蕈碱。在一些实施方案中,连接至抗LYPD3抗体的化学治疗剂是细菌毒素,特别是炭疽毒素。EP 16 151 774.3和LU 92659中也描述了合适的抗体药物偶联物,此处明确提及。

[0302] 关于联合疗法,下文描述了可能与抗LYPD3抗体缀合的其它合适的毒素。

[0303] 4. 编码抗LYPD3抗体的核酸

[0304] 在另一方面,本发明提供编码抗LYPD3抗体的核酸。该核酸的核酸序列可以具有适合于编码抗体的任何核苷酸序列。然而,优选地,核酸序列至少部分地适应于将在其中表达核酸的宿主细胞或生物体的特定密码子使用,特别是人密码子使用。核酸可以是双链或单链DNA或RNA,优选双链DNA诸如cDNA或单链RNA诸如mRNA。其可以是一个连续的核酸分子,也可以由几个核酸分子组成,每个核酸分子编码抗体的不同部分。

[0305] 如果抗LYPD3抗体由多于一个的不同氨基酸链(诸如轻链和重链)组成,则核酸可以是例如单个核酸分子,所述单个核酸分子包含多个编码区,每个编码区编码抗体的一个氨基酸链,优选地由诸如IRES元件的调节元件分开以产生分开的氨基酸链,或者核酸可以

由多个核酸分子组成,其中每个核酸分子包含一个或多个编码区,每个编码区编码抗体的一个氨基酸链。备选地,核酸可以是含有一个编码重链和轻链的编码区的单个核酸分子,所述重链和轻链由自切割肽(诸如2A肽)和/或含有蛋白酶识别位点(诸如弗林蛋白酶识别位点)的接头肽分开。除了编码抗体的编码区之外,核酸可以还包含其它核酸序列或其它修饰,例如,所述其它核酸序列或其它修饰可以编码其它蛋白质,可以影响编码区的转录和/或翻译,可以影响核酸的稳定性或其它物理或化学性质,或者可能根本没有功能。

[0306] 在某些实施方案中,核酸是可用于感染人类细胞的病毒载体。这些病毒载体可以适用于例如人类的疗法,例如通过将病毒的感染和/或复制引导至疾病细胞诸如肿瘤细胞,或者在抗LYPD3抗体呈嵌合抗原受体的形式的实施方案中修饰T细胞以获得CAR T细胞。

[0307] 在另一方面,本发明提供一种表达盒或载体,其包含本发明所述的核酸和与所述核酸操作性连接的启动子。另外,表达盒或载体可以包含其它元件,特别是能够影响和/或调控以下各项的元件:核酸的转录和/或翻译,表达盒或载体的扩增和/或再产生,表达盒或载体整合到宿主细胞基因组中,和/或宿主细胞中的表达盒或载体的拷贝数。包含用于表达抗体的相应表达盒的合适表达盒和载体在现有技术中是众所周知的,因此,这里不需要进一步的描述。

[0308] 5. 宿主细胞

[0309] 此外,本发明提供一种宿主细胞,其包含本发明所述的核酸或本发明所述的表达盒或载体。宿主细胞可以是任何宿主细胞。所述宿主细胞可以是分离的细胞或包含在组织中的细胞。优选地,宿主细胞是培养出的细胞,特别是原代细胞或建立的细胞系的细胞,优选地源自肿瘤细胞。合适的宿主细胞特别是真核宿主细胞,尤其是哺乳动物宿主细胞。示例性宿主细胞包括酵母细胞诸如巴斯德毕赤酵母细胞系、昆虫细胞诸如SF9和SF21细胞系、植物细胞、鸟类细胞诸如EB66鸭细胞系、啮齿动物细胞诸如CHO、NS0、SP2/0和YB2/0细胞系,和人类细胞诸如HEK293、PER.C6、CAP、CAP-T、AGE1.HN、Mutz-3和KG1细胞系。

[0310] 在本发明的优选的实施方案中,宿主细胞是CHO细胞或源自人髓系白血病细胞的细胞。优选地,所述宿主细胞选自以下细胞或细胞系:K562,KG1,MUTZ-3,CHO或源自其的细胞或细胞系。宿主细胞优选地选自:CHO,NM-H9D8,NM-H9D8-E6,NM H9D8-E6Q12和源自任一所述宿主细胞的细胞或细胞系。这些细胞系及其性质在PCT申请W0 2008/028686A2中有详细描述。在某些实施方案中,宿主细胞被优化以用于表达具有特定糖基化模式的糖蛋白,特别是抗体。优选地,本发明所述的核酸的编码区和/或启动子中的密码子使用和表达盒或载体的其它元件与所用的宿主细胞的类型相容,并且更优选地针对所用的宿主细胞的类型进行优化。优选地,抗LYPD3抗体由如上所述的宿主细胞或细胞系产生。

[0311] 本发明还提供携带抗LYPD3 CAR的宿主细胞。这种宿主细胞在本文中也称为CAR细胞。CAR细胞特别包含本发明所述的核酸或本发明所述的表达盒或载体,其编码抗LYPD3 CAR。在某些实施方案中,CAR细胞被工程化改造以表达抗LYPD3 CAR,例如通过引入载体,所述载体包含抗LYPD3 CAR的表达盒。

[0312] 在特定实施方案中,CAR细胞是白细胞,尤其是淋巴细胞诸如T细胞、NK细胞和NKT细胞,或单核细胞诸如巨噬细胞。CAR细胞特别是原代白细胞。在某些实施方案中,CAR细胞选自:原代T细胞,原代NK细胞,原代NKT细胞和原代巨噬细胞,尤其是原代T细胞。

[0313] 6. 药物组合物和治疗用途

[0314] 在另一方面,本发明提供包含抗LYPD3抗体、核酸、表达盒或载体、宿主细胞或缀合物的组合物。该组合物可以还含有多于一种的这些组分。此外,该组合物可以包含选自以下各项的一种或多种其它组分:溶剂、稀释剂和赋形剂。优选地,该组合物是药物组合物。在该实施方案中,组合物的组分优选地都是药学上可接受的。该组合物可以是固体或流体组合物,特别是溶液(优选水溶液)、乳液或悬浮液或冻干粉末。

[0315] 抗LYPD3抗体或其缀合物或CAR细胞在特别是在医学中有用,特别是在疾病的疗法、诊断、预后和/或监测中,疾病特别是如本文所述的疾病,例如癌症和感染,优选癌症。因此,在另一方面,本发明提供用于医学用途的抗LYPD3抗体、核酸、表达盒或载体、宿主细胞、缀合物或组合物。优选地,在医学中的用途是用于疾病(尤其是与LYPD3相关的疾病)的治疗、预后,诊断和/或监测的用途。示例性疾病包括与异常细胞生长相关的疾病,诸如癌症、青少年特发性脊柱侧弯、胆固醇酯转移蛋白(CETP)缺乏症、鱼眼病、混合型高脂血症、瓜氨酸血症和家族性高胆固醇血症。

[0316] 在优选的实施方案中,疾病是癌症。优选地,癌症选自:头颈癌,结肠癌,结直肠癌,肝细胞癌,皮肤癌,宫颈癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,肾癌,食道癌,肺癌和生殖区域癌。例如,癌症可以是头颈部鳞状细胞癌、食道癌、乳腺癌、宫颈癌、皮肤癌或肛门区域、直肠、口腔、唇部、颊腔、鼻、阴茎、外阴、会厌、舌或皮肤的鳞状细胞癌。

[0317] 癌症是LYPD3阳性的,并且特别包含在其细胞表面携带LYPD3的癌细胞。在特定实施方案中,抗LYPD3抗体与另一种抗癌治疗剂联合使用。所述另一种治疗剂可以是任何已知的抗癌药物,并且特别可以是针对癌抗原的抗体。用于与抗LYPD3抗体联合的合适的抗体包括:抗EGFR抗体,诸如西妥昔单抗(cetuximab,Erbitux)、托木妥昔单抗(tomuzotuximab)、帕尼单抗(panitumomab,Vectibix)和尼妥珠单抗(Nimotuzumab,Theraloc);抗HER2抗体,诸如曲妥珠单抗(Trastuzumab,Herceptin)、替米妥珠单抗(timigutuzumab)和帕妥珠单抗(pertuzumab);抗VEGF抗体,诸如贝伐珠单抗(Bevacizumab,Avastin)和伐努赛珠单抗(vanuzizumab);抗CD52抗体,诸如阿仑单抗(alemtuzumab,Campath);抗CD30抗体,诸如维布妥昔单抗(brentuximab,Adcetris);抗CD33抗体,诸如吉妥珠单抗(gemtuzumab,Mylotarg);抗CD20抗体,诸如利妥昔单抗(Rituxan,Mabthera),托西莫单抗(tositumomab,Bexxar)和替伊莫单抗(ibritumomab,Zevalin);抗CTLA-4抗体,诸如伊匹单抗(ipilimumab)和替西木单抗(tremelimumab)、抗PD1/PD-L1抗体,诸如帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、西米普利单抗(cemiplima)、阿替利珠单抗(atezolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)和阿维鲁单抗(avelumab)、抗TNF和TNFR超家族成员的抗体,如乌瑞芦单抗(urelumab),MEDI6469,TRX518和varilumab;CSF1R抗体,如依米妥珠单抗(emactuzumab);抗B7-H3抗体,如依诺妥珠单抗(enoblituzumab);抗LAG3抗体;抗4-1BB抗体;抗ICOS抗体;和抗OX-40抗体。用于与抗LYPD3抗体联合的其它合适抗体包括双特异性抗体,尤其是免疫细胞募集性双特异性抗体,诸如博纳吐单抗(blinatumomab,靶向CD19和CD3)、奥尼妥单抗(odronextamab,靶向CD20和CD3)、Regn4018(靶向MUC16和CD3)、Regn4336(靶向PSMA和CD3)和Regn7075(靶向EGFR和CD28)。

[0318] 可以与抗LYPD3抗体和任选地一种或多种其它抗体联合使用的其它抗癌治疗剂可以选自:紫杉烷,诸如紫杉醇(Taxol),多西紫杉醇(Taxotere)和SB-T-1214;环磷酰胺;拉帕替尼;厄洛替尼;伊马替尼;帕唑帕尼;卡培他滨;阿糖胞苷;长春瑞滨;吉西他滨;蒽环类

药物,诸如柔红霉素,阿霉素,表阿霉素,伊达比星,戊柔比星和米托蒽醌;芳香化酶抑制剂,诸如氨格鲁米特,睾内酯(Teslac),阿那曲唑(Arimidex),来曲唑(Femara),依西美坦(Aromasin),伏罗唑(Rivizor),福美斯坦(Lentaron),法曲唑(Afema),4-羟基雄烯二酮,1,4,6-雄甾三烯-3,17-二酮(ATD)和4-雄烯-3,6,17-三酮(6-OXO);拓扑异构酶抑制剂,诸如伊立替康,托泊替康,喜树碱,海带多糖D,依托泊苷(VP-16),替尼泊甙,阿霉素,柔红霉素,米托蒽醌,安丫啟,玫瑰树碱,金精三羧酸和HU-331;基于铂的化学治疗剂,诸如顺式二胺二氯铂(II)(顺铂),顺式二胺(1,1-环丁二羧酸)铂(II)(卡铂)和[(1R,2R)-环己烷-1,2-二胺](乙二醇-0,0')铂(II)(奥沙利铂);抗代谢物,特别是抗叶酸盐,诸如甲氨蝶呤,培美曲塞,雷替曲塞和普拉曲沙;嘧啶类似物,诸如氟尿嘧啶,吉西他滨,氟尿苷,5-氟尿嘧啶和替加氟尿嘧啶(tegafur-uracil),和嘌呤类似物;和酶聚ADP核糖聚合酶的抑制剂(PARP抑制剂),诸如奥拉帕尼(olaparib),卢卡帕尼(rucaparib),尼拉帕利(niraparib)和他拉唑帕利(talazoparib)。可以与抗LYPD3抗体联合使用的其它合适的毒素如上文关于可能与抗体缀合的试剂的描述。

[0319] 用抗LYPD3抗体的治疗可以还与以下各项联合:免疫刺激剂,细胞因子,趋化因子,放射疗法,治疗细胞诸如天然免疫细胞或工程化改造的免疫细胞(CAR-T细胞,TCR-T细胞,CAR-NK细胞,CAR-单核细胞,CAR-NKT细胞等),疫苗诸如蛋白质、肽或RNA疫苗,B-Raf抑制剂诸如维罗非尼(vemurafenib)、地塞米松,蛋白酶抑制剂诸如硼替佐米和来那度胺(lenalidomide)。

[0320] 对于用于治疗其中细胞表达LYPD3的癌症的用途,抗体可以如上文所述与其它试剂偶联,其中其它试剂优选地是细胞毒性剂,诸如放射性核素或细胞毒素。上文描述了示例性的细胞毒性剂。细胞毒性剂还包括仅在活化(例如通过光照射或体内的酶促反应)时产生细胞毒性活性的前体化合物。上述一种或多种抗癌治疗剂也可用作与抗LYPD3抗体偶联的其它试剂。此外,可以对抗体进行工程化改造,以增强其激活患者的免疫应答的能力,特别是激活ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和/或CDC(补体依赖性细胞毒性)的能力。例如,这可以通过优化抗体(特别是所述抗体的恒定区)的氨基酸序列和/或糖基化模式来实现。

[0321] 为了在疾病的诊断、预后和/或监测中用作检测剂,抗体优选地与能够产生可检测信号的标记剂偶联。特别地,所述标记剂可以是放射性核素、荧光团或酶。

附图说明

[0322] 图1显示Tn和TF碳水化合物抗原的生物合成途径及其结构。在结构中,正方形代表GalNAc,圆形代表Gal,菱形代表唾液酸。

[0323] 图2显示抗LYPD3抗体与以下各项的糖依赖性靶向结合:A)LYPD3-ECD或B)ECD的富含STP的C末端部分(LYPD3-STP-ECD)。使用5 μ g/ml的 α -LYPD3 mAb在抗原ELISA中评估与等摩尔量的抗原(35nM)的结合。为了对照ELISA板上的抗原包被,使用了 α LYPD3 pAb或 α MBL Ab。蛋白质以各自的O-糖基化模式(F9,0-glyc)在转染的NM-F9细胞中表达并纯化,通过酶消化这些NM-F9蛋白产生去O-糖基化的蛋白(F9-de-O-glyc)。还测试了与从O-糖基化缺陷的CHO细胞中重组地表达和纯化的LYPD3-STP-ECD(aglyc)的结合。高O.D.信号表明抗体与抗原的强结合。

[0324] 图3显示抗LYPD3克隆与不同糖基化的LYPD3变体的结合。使用指定浓度的aLYPD3 mAb在抗原ELISA中评估与等摩尔量抗原 (35nM) 的结合。使用aLYPD3 pAb或aMBL Ab作为包被对照,aTF和aTn抗体作为糖基化对照。如实施例1所述,携带TF和Tn的蛋白质从NM-F9细胞重组地表达和纯化,由源自NM-F9的蛋白质的酶消化产生去O-糖基化的蛋白质,通过源自NM-F9的蛋白质的去半乳糖基化产生Tn蛋白质。高O.D. 信号表明抗体与抗原的强结合。

[0325] 图4显示通过ELISA测试聚糖结合的抗LYPD3克隆的分析。使用5 μ g/ml的aLYPD3 mAb在抗原ELISA中评估用10 μ g/ml包被的PAA缀合聚糖的结合;aTn、aTF和a-sTn mAb用于对照所示4种聚糖在ELISA板上的包被。高O.D. 信号表明抗体与抗原的强结合。

[0326] 图5显示ELISA中抗huLYPD3抗体与源自NM-F9的LYPD3-STP的结合曲线。在包被有LYPD3-STP-ECD靶蛋白的ELISA平板上滴定抗LYPD3抗体。高O.D. 信号表明抗体与抗原的强结合。

[0327] 图6显示与aLYPD3 mAb、aTF和aTn相比,抗LYPD3抗体与LYPD3-ECD的糖依赖性抗原结合。使用a-LYPD3 mAb在抗原ELISA中评估与等摩尔量的抗原的结合。蛋白质在转染的NM-F9或NM-H9D8细胞(具有各自的O-糖基化模式(NM-F9:主要是TF;H9D8:主要是sTF和TF))中表达并纯化。去唾液酸化的蛋白质是通过用唾液酸酶(H9D8,de-sialyl.:主要是TF)的酶处理蛋白质产生的,用半乳糖苷酶(NM-F9,Tn-glyc:主要是Tn)处理产生去半乳糖基化的蛋白质。高O.D. 信号表明抗体与抗原的强结合。

[0328] 图7显示aLYPD3克隆与细胞O-glyc和去O-glyc LYPD3的结合。具有不同LYPD3表达(LYPD3-F9=高O-糖基化,高LYPD3;NM-F9=高O-糖基化,低LYPD3;LYPD3-HEK-O-glyc KO=无O-糖基化,高LYPD3)的细胞系用1 μ g/ml的aLYPD3克隆、对照aLYPD3 pAb和mAb和aTF mAb染色。显示的是染色的细胞的信噪比:染色的细胞的MFI(中值荧光强度)除以同种型染色的细胞的MFI。

[0329] 图8显示与表达高水平的O-glyc LYPD3的LYPD3-F9细胞上的对照aLYPD3 mAb相比,aLYPD3克隆的滴定。细胞用不同浓度的aLYPD3克隆和aLYPD3 mAb对照染色,并用荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测。显示的是活细胞的MFI。

[0330] 图9显示在表达高水平的O-glyc LYPD3的LYPD3-F9细胞上滴定aLYPD3克隆。细胞用不同浓度的aLYPD3克隆染色,并用荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测。显示的是活细胞的MFI。

[0331] 图10显示aLYPD3克隆与正常人上皮乳腺细胞(HMEC)的结合。来自健康供体的HMEC用10 μ g/ml aLYPD3克隆和荧光团偶联的抗人IgG二级试剂染色。使用对照aLYPD3 pAb和mAb和aTF mAb证实了LYPD3和TFa的表达。显示的是染色的细胞的信噪比:染色的细胞的MFI(中值荧光强度)除以同种型染色的细胞的MFI。

[0332] 图11显示aLYPD3克隆与Caov-3细胞、有和没有唾液酸酶处理的ZR-75-1细胞、和唾液酸酶处理后的MDA-MB-231细胞的结合。(A) Caov-3细胞用10 μ g/ml aLYPD3克隆和荧光团偶联的抗人IgG二级试剂染色。(B) ZR-75-1细胞用唾液酸酶处理(30分钟,5mU/ml)或不处理,洗涤并用10 μ g/ml aLYPD3克隆和荧光团偶联的抗人IgG二级试剂染色。(C) MDA-MB-231细胞用唾液酸酶处理(30分钟,5mU/ml),然后用10 μ g/ml aLYPD3克隆和荧光团偶联的抗人IgG二级试剂染色。使用对照aLYPD3pAb和mAb和aTF mAb证实了LYPD3和TFa的表达。显示的是染色的细胞的信噪比:染色的细胞的MFI(中值荧光强度)除以同种型染色的细胞的MFI。

[0333] 图12显示aLYPD3克隆17B3抑制LYPD3-F9细胞的增殖的能力。将细胞与不同浓度的aLYPD3抗体17B3和恒定量的蛋白G-MMAE一起孵育。4天后测量增殖。不相关的人IgG1对照显示无抑制。基于发光信号,增殖显示为相对于不含抗体的培养基对照的百分比(%)。

[0334] 图13显示与aLYPD3 pAb对照抗体相比,选择的抗LYPD3克隆与健康食管组织切片的结合。

[0335] 图14显示通过流式细胞术确定的人源化aLYPD3抗体与细胞O-glyc和去O-glyc LYPD3的结合。(A) 具有不同LYPD3表达和O-糖基化的细胞系(LYPD3-ECD HEK O-glyc KO=无O-糖基化,高LYPD3;模拟F9 O-glyc.=具有TF的高O-糖基化,低LYPD3;LYPD3-ECD F9=具有TF的高O-糖基化,高LYPD3)用10 μ g/ml的人源化aLYPD3抗体(21E9-219至21E9-228)、亲本抗体(亲本21E9)和针对LYPD3的对照抗体(aLYPD3 pAb和aLYPD3 mAb)染色。(B) 将表达具有TF O-糖基化的LYPD3的细胞系NM-F9用不同浓度(0.1 μ g/ml和10 μ g/ml)的人源化抗体染色。显示的是染色的细胞的信噪比:染色的细胞的MFI(中值荧光强度)除以同种型染色的细胞的MFI。

[0336] 图15显示人源化aLYPD3抗体与F9细胞中O-糖基化的LYPD3-STP-ECD的结合。使用指定浓度的人源化aLYPD3 mAb和亲本aLYPD3 mAb,在抗原ELISA中评估与等摩尔量的抗原的结合。蛋白质在转染的NM F9细胞中表达并纯化,并携带TF O-糖基化。高O.D.信号表明抗体与抗原的强结合。

[0337] 图16显示人源化aLYPD3抗体的聚糖特异性结合。使用指定浓度的aLYPD3 mAb在抗原ELISA中评估与等摩尔量的抗原的结合。蛋白质在转染的具有各自的O-糖基化模式的NM F9细胞中表达并纯化,并且不经处理(F9 O-glyc.:主要是TF)、去半乳糖基化(F9 O-glyc.de-gal.:主要是Tn)或去糖基化(F9 de-O-glyc.:无O-糖基化)。高O.D.信号表明抗体与抗原的强结合。

[0338] 实施例

[0339] 实施例1:抗原的产生

[0340] 产生了人LYPD3的不同O-糖基化变体,用于优化选择与具有肿瘤相关糖基化模式的人LYPD3特异性结合的抗体。由于huLYPD3胞外结构域的C末端部分(氨基酸234-303)含有大量的Ser/Thr/Pro残基,并因此含有高密度的O-糖基化位点,因此选择该huLYPD3氨基酸序列作为靶结构(“LYPD3-STP”)用于抗体产生,在实施例2中描述的抗体产生方法中具有产生糖依赖性抗LYPD3抗体的高潜力。

[0341] 用编码huLYPD3胞外结构域(ECD;氨基酸31-303)、尤其是huLYPD3的C末端富含Ser/Thr/Pro的结构域(STP-ECD;氨基酸234-303)的DNA转染不同的细胞系,以产生表达可溶性LYPD3-ECD或LYPD3-STP-ECD的细胞。可溶性蛋白构建体重组地表达为融合蛋白,例如,串联版本的Strep-tag[®](Twin-Strep-tag[®], IBA, 德国)、麦芽糖结合凝集素(此处称为MBL)或多组氨酸标签,以通过亲和层析从细胞上清液中纯化,并通过融合部分独立于LYPD3而检测蛋白质。此外,用编码完整的人LYPD3原肽序列(氨基酸31至346)或huLYPD3原肽的C末端富含Ser/Thr/Pro的结构域(氨基酸234-346)与C末端EGFP融合在一起的融合体的DNA转染不同的细胞系,以产生分别在细胞表面表达膜结合LYPD3或LYPD3-STP的细胞。

[0342] 源自癌细胞系的NM F9和NM-H9D8细胞用于表达具有肿瘤相关O-糖基化模式的人LYPD3和LYPD3-STP蛋白:虽然NM-H9D8细胞提供具有高度唾液酸化的LYPD3的糖基化(主要

是sTF和sTn),但唾液酸化缺陷型NM-F9细胞主要产生携带TF和少量的Tn的LYPD3。O-糖基化缺陷型(0-glyc K0)CHO(CH-O-缺失;GlycoDisplay Aps,Copenhagen,丹麦)或HEK细胞(HEK GALE/GALEK2 K0,Kerafast,Inc,Boston,MA,美国)用于生产不含O-糖基化的LYPD3变体。

[0343] Tn-LYPD3-STP-ECD要么在产生核心10-聚糖延伸方面有缺陷的HEK细胞(HEK293 cosmc K0,Glycodisplay)中重组地表达,要么通过用 β -半乳糖苷酶(GalactEX0,Genovis)酶促消化源自NM-F9的LYPD3-STP-ECD产生,以从TF结构中去掉半乳糖残基,导致GalNAc与丝氨酸或苏氨酸连接,称为Tn抗原。

[0344] 不含O-糖基化的可溶性LYPD3蛋白要么从转染的O-糖基化缺陷型CHO细胞的上清液中直接纯化,要么通过酶促消化从NM-H9D8或NM-F9转染子纯化的蛋白质中产生。后者是在微型离心柱中应用可溶性唾液酸酶、O-糖苷酶和 α -N-乙酰半乳糖胺酶或固定的 β -半乳糖苷酶和GalNAcase酶进行的,以去除糖蛋白上的唾液酸(α 2-3、 α 2-6和 α 2-8)、核心1的O-聚糖和GalNAc残基(SialExo、Oglyzor、GalNAcEX0、GalactEX0全部来自Genovis)。

[0345] 如实施例3所述,在ELISA测定中评估抗huLYPD3抗体与纯化的可溶性蛋白的结合,同时使用流式细胞术分析与不同糖基化的膜结合LYPD3的结合。

[0346] 实施例2:抗LYPD3抗体的产生

[0347] 通过噬菌体展示技术或通过动物免疫产生特异性识别具有肿瘤相关糖基化模式的huLYPD3的富含STP的结构域的单克隆抗体。在任何情况下,以蛋白质形式携带由癌细胞产生的O-聚糖结构的huLYPD3和实施例1中描述的细胞都是抗体产生过程的组成部分。选择所有抗体以O-糖基化依赖性方式结合人LYPD3。

[0348] HybriFree技术用于用从转染的NM-F9细胞中纯化的LYPD3-ECD或富含STP的ECD部分(LYPD3-STP-ECD)免疫并用LYPD3-ECD加强的鸡和兔的脾细胞中分离LYPD3特异性抗体。在动物最后一次免疫后,从脾分离细胞,通过流式细胞术(类似于实施例4中描述的程序)和/或ELISA测定(类似于实施例3中描述的程序)评估血清或鸡蛋黄制品中具有证实的抗原特异性抗体应答。最初通过耗尽显示不需要的蛋白质结合的细胞来富集对O糖基化的LYPD3-STP具有抗原特异性的脾B细胞。这包括与不含糖基化的LYPD3-STP-ECD的结合和/或与不存在任何LYPD3序列的重组表达的蛋白质融合配偶体的结合,和/或与不相关的糖蛋白结合,所述不相关的糖蛋白以类似于O-糖基化的LYPD3-STP-ECD的方式产生,并通过其含有相同的蛋白质融合配偶体以及与非同源蛋白质序列结合的类似的聚糖结构。对于该阴性选择步骤,首先将脾细胞与固定在微量滴定板上和/或存在于淘选溶液中的脱靶蛋白一起孵育。随后,将未结合的细胞转移到包被有从NM-F9细胞纯化的O糖基化的LYPD3-STP-ECD或LYPD3-ECD蛋白的平板上,以捕获具有靶标特异性的脾B细胞。从捕获的细胞中扩增抗体可变结构域的cDNA,分别克隆到具有IgG重链和轻链的单独表达盒的质粒中,以在哺乳动物表达载体中构建组合的人IgG1编码文库。将来自所得抗体文库集的质粒DNA转染到CHO细胞中,以瞬时产生嵌合抗体。抗体迷你库细胞培养上清液在ELISA中用各种靶向和脱靶蛋白和额外地通过流式细胞术在LYPD3转染的HEK 0-glyc K0细胞和/或LYPD3转染的F9对比与未转染的NM-F9细胞上进行靶特异性结合测试。用于ELISA筛选的蛋白质包括O-糖基化的LYPD3-ECD和LYPD3-STP-ECD(两者都在NM-F9细胞中表达并从中纯化),以及LYPD3-ECD和LYPD3-STP-ECD(两者都没有糖基化)。从显示与O-糖基化的LYPD3-STP特异性结合的抗体库

产生单个克隆。对抗原特异性单克隆的VH和VL cDNA进行测序,并在CHO细胞中表达具有独特序列的抗体。在抗体纯化之前,通过ELISA以及流式细胞术证实了单克隆上清液中抗原特异性抗体的产生。

[0349] 通过免疫鸡或兔获得以下糖基化特异性的抗huLYPD3抗体:

[0350] 16F9 17B3 19B4 19G10 21E9

[0351] 22A11 25A6 26A4

[0352] 通过噬菌体展示技术从Yumab (YUMAB GmbH, Braunschweig, 德国) 的幼稚人抗体文库中分离出完全人糖特异性抗huLYPD3抗体。简而言之,使用不同的策略(结合随后对纯化的蛋白质和细胞的淘选反应),通过三轮的抗体选择从文库中富集对O糖基化的LYPD3-STP具有抗原特异性的噬菌体。在每个步骤中,通过与O-糖基化的LYPD3-STP-ECD或LYPD3-ECD结合来实现产生scFv的噬菌体的阳性选择,其中O-糖基化的LYPD3-STP-ECD或LYPD3-ECD两者均从NM-F9细胞产生并固定在微量滴定板上。为了竞争,淘选溶液中存在纯化的不含LYPD3序列的重组表达的蛋白融合配偶体和不含O-糖基化的LYPD3-ECD和LYPD3-STP-ECD,以耗尽识别这些结构的抗体。对于一些策略,在耗尽与未转染的NM-F9细胞结合的噬菌体后,通过与LYPD3-STP转染的NM-F9细胞孵育来完成第二和/或第三富集步骤。对于其它策略,在耗尽未与转染的NM-F9结合的噬菌体后,利用与LYPD3转染的NM-F9细胞或神经氨酸酶处理的Caov-3细胞(表达高水平的LYPD3和TFa聚糖的卵巢腺癌细胞系)的结合进行抗体选择。从每种选择策略的单个克隆产生可溶性scFv抗体,并通过ELISA在有和没有O糖基化的LYPD3-ECD和LYPD3-STP-ECD蛋白上进行筛选。还通过流式细胞术测试了在ELISA中具有糖依赖性LYPD3结合的scFv抗体与用LYPD3或LYPD3-STP转染的NM-F9细胞以及神经氨酸酶处理的Caov-3细胞的特异性结合。对在ELISA中和在LYPD3阳性细胞上特异性识别O-糖基化的LYPD3-STP的克隆的VH和VL DNA进行测序后,将独特的抗体VH和VL序列克隆到鼠IgG2a表达载体中,以用于转染HEK细胞。

[0353] 通过从人抗体的噬菌体展示文库中分离以获得以下糖基化特异性抗huLYPD3抗体:

[0354] YU912-B09 YU912-G05 YU912-B06 YU913-B01 YU912-D06

[0355] YU912-A03 YU912-C07 YU912-G08 YU912-G07

[0356] 通过蛋白A亲和层析从哺乳动物细胞培养上清液中纯化所有选择的抗体。用SDS-PAGE和分析SEC证实了mAb的纯度和完整性。

[0357] 对于一些实验,还将抗人LYPD3抗体的VH和VL序列克隆到鼠IgG1表达载体中,以纯化具有小鼠IgG骨架的嵌合抗体。如用ELISA和流式细胞术测定证实的,表达为具有相同VH和VL组合的人IgG1或鼠IgG1的纯化的嵌合抗LYPD3针对可溶性以及膜结合蛋白均显示出相似的结合特性。

[0358] 实施例3:具有靶向和非靶向对照的抗原ELISA

[0359] 在抗原ELISA测定中分析了抗体与携带肿瘤相关聚糖的LYPD3的特异性结合。

[0360] 简而言之,将不同糖基化和非糖基化的蛋白抗原或与碳水化合物-聚丙烯酰胺缀合物(碳水化合物-PAA缀合物, GlycoNZ) 缀合的聚糖包被到96孔板中过夜,阻断非特异性结合并添加测试抗体样品。在一些测定中,使用抗huLYPD3 huIgG1对照单克隆Ab,所述对照单克隆Ab在表达源自专利申请WO 2011/070088 A1的抗体序列(WO 2011/070088的SEQ ID

N0:51和52)后从CHO细胞上清液中纯化(“aLYPD3 mAb”)。该对照抗huLYPD3抗体以不依赖糖基化的方式与人LYPD3的胞外结构域结合。为了对照ELISA板上的蛋白抗原包被,使用了抗huLYPD3兔多克隆抗体(R&D Systems,目录号AF5428)(“aLYPD3-pAb”)或a-MBL抗体(Novusbio)(“aMBL”,构建体表达为MBL融合蛋白)。识别特定聚糖结构的抗体用于检测包被的蛋白质的糖基化。抗TFa(“aTF”)抗体克隆HH8由哥本哈根大学的Clausen教授提供。特异性识别Tn的抗体(“aTn”) (克隆5F4) 购自SBH Sciences,或由哥本哈根大学的Clausen教授提供。然后,加入过氧化物酶偶联的抗IgG二抗,然后进行3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物反应。通过使用多功能微孔板读数仪(PerkinElmer EnSpire2300或Tecan Spark)测量450nm和620nm或630nm处(作为参考波长)的吸光度来确定抗体结合率。

[0361] 在抗原ELISA中评估了产生的a-huLYPD3抗体与huLYPD3的富含STP的结构域的糖依赖性结合(图2)。所有抗体均显示与O-糖基化的LYPD3-STP-ECD和O-糖基化的LYPD3-ECD蛋白(其也含有LYPD3-STP序列)的显著结合,证实了这些抗体识别的表位存在于huLYPD3氨基酸序列R234-H303中。通过酶去O-糖基化或通过由O-糖基化缺陷型细胞的重组表达和纯化,实现了在测试的LYPD3蛋白上不存在O-糖基化,从而消除了a-LYPD3抗体的结合。这清楚地表明,抗体结合需要O糖基化的LYPD3表位,并因此证实所有选择的抗体的LYPD3结合的糖依赖性。然而,a-LYPD3对照mAb能够独立于O-糖基化识别LYPD3-ECD,并且不能结合任何的LYPD3-STP-ECD变体。因此,该抗体独立于糖基化结合位于huLYP3的氨基酸31-233中的LYPD3表位。

[0362] 此外,抗huLYPD3抗体克隆似乎引发了关于LYPD3 O-糖基化的类型的多种精细特异性。这从以下各项的不同程度的识别可以明显看出:从NM-H9D8(提供了高度的唾液酸化)表达和纯化的LYPD3蛋白(主要携带sTF和一些TF),用唾液酸酶处理的NM-H9D8表达的LYPD3(主要携带TF),去半乳糖基化的LYPD3-STP-ECD(主要携带Tn糖基化,Tn-glyc.)。对于在有和没有酶处理的不同细胞系中表达的LYPD3,确定了LYPD3上不同O-糖基化结构的相对量:

[0363] 表1-LYPD3上的糖基化结构

	% TF	% Tn	% sTF	% sTn
LYPD3 (NM-F9)	96.6	3.4	0	0
LYPD3 (NM-F9,de-gal.)	6.6	93.4	0	0
LYPD3 (NM-H9D8)	38.9	2.0	52.3	6.8
LYPD3 (NM-H9D8,de-sial.)	91.1	8.9	0	0

[0365] 分析的抗体显示与O-糖基化的LYPD3的强、高度特异性结合,但与不相关的O-糖基化的蛋白质(图3)或纯碳水化合物抗原(图4)没有显著结合。因此,抗LYPD3抗体克隆的结合也特异性地依赖于LYPD3蛋白骨架。

[0366] 比较了抗LYPD3抗体对糖基化的LYPD3-STP-ECD(在NM-F9细胞中表达)的结合亲和力。所有抗LYPD3抗体均显示出与O-糖基化的LYPD3-STP靶结构的剂量依赖性结合,所述结合具有高亲和力,并且EC50值在 4×10^{-10} 至 4×10^{-11} M之间(图5)。

[0367] 还比较了抗LYPD3克隆17B3和21E9对携带TF的LYPD3(在NM-F9细胞中表达,或在NM-H9D8中表达并用唾液酸酶处理)、主要携带sTF(唾液酸化的TF)和一些TF的LYPD3(在NM-H9D8细胞中表达)和携带Tn的LYPD3(在NM-F9细胞中表达并用半乳糖苷酶处理)的结合亲和力。两种克隆均显示出与TF糖基化的LYPD3的强结合,而21E9额外地识别Tn糖基化的LYPD3

(图6)。

[0368] 实施例4:与在细胞系中表达的O-glyc.和de-O-glyc.LYPD3的结合

[0369] 测试了aLYPD3克隆与具有LYPD3的不同糖基化状态的细胞系的结合。LYPD3转染的NM-F9 (LYPD3-F9) 表达携带非唾液酸化的O-聚糖的LYPD3,未转染的NM-F9 (相应的WT细胞) 表达内源性水平的LYPD3,和LYPD3转染的HEK-O-glyc KO (LYPD3-HEK-O-glyc.KO) 表达没有O-聚糖的LYPD3,将这些细胞用aLYPD3克隆染色,并通过荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测。使用对照aLYPD3 pAb和mAb和aTF mAb证实了LYPD3和TFa的表达。为了确定背景染色,包括了不相关的hIgG1对照。DAPI用于区分活细胞和死细胞。使用Canto II (BD) 流式细胞仪分析细胞。

[0370] 结果显示,所有aLYPD3克隆均与LYPD3-F9和NM-F9上的O-糖基化的LYPD3结合,但不与LYPD3-HEK-O-glyc KO细胞上的非O-糖基化的LYPD3结合。与NM-F9细胞的结合与用aLYPD3 pAb和mAb的染色相当(图7)。

[0371] 实施例5:在LYPD3-F9细胞上滴定aLYPD3克隆

[0372] 为了比较不同aLYPD3克隆的结合亲和力,表达高水平的O-glyc.LYPD3的LYPD3-F9细胞用不同浓度的aLYPD3克隆进行染色,并用荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测结合的抗体。为了确定背景染色,包括了不相关的hIgG1对照,并使用DAPI区分活细胞和死细胞。使用Canto II (BD) 流式细胞仪分析细胞。

[0373] 所有aLYPD3克隆均显示出与LYPD3-F9细胞的剂量依赖性结合(图8和9)。aLYPD3克隆的结合与aLYPD3 mAb对照的范围相同(图8)。克隆16F9、19G10、21E9、22A11和25A6显示出非常相似的结合亲和力,所述结合亲和力略高于克隆17B3、19B4和26A4的结合亲和力(图9)。

[0374] 实施例6:aLYPD3克隆不与正常人上皮乳腺细胞上表达的LYPD3结合

[0375] 为了证明aLYPD3克隆不与主要在正常人细胞上发现的LYPD3糖型结合,将来自健康供体的人上皮乳腺细胞(HMEC)用aLYPD3克隆染色,并通过荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测。使用对照aLYPD3 pAb和mAb和aTF mAb证实了LYPD3和TFa的表达。为了确定背景染色,包括了不相关的hIgG1对照。DAPI用于区分活细胞和死细胞。使用Canto II (BD) 流式细胞仪分析细胞。

[0376] 用对照抗体aLYPD3 pAb和mAb和aTF mAb测定,HMEC表达中等水平的LYPD3 (~40% LYPD3阳性),但几乎没有TFa。aLYPD3克隆均未显示与HMEC上表达的LYPD3结合(图10)。

[0377] 实施例7:aLYPD3克隆与肿瘤细胞系的结合

[0378] 为了检测aLYPD3克隆与肿瘤细胞系的结合,选择了具有LYPD3和TFa的不同表达水平的不同细胞系:Caov-3 (卵巢腺癌细胞系,LYPD3+),ZR-75-1 (乳腺癌细胞系,LYPD3+) 和MDA-MB-231 (乳腺癌细胞系,LYPD3-)。用唾液酸酶处理MDA-MB-231和ZR-75-1以去除细胞表面的唾液酸。用aLYPD3克隆对肿瘤细胞系进行染色,并使用荧光团偶联的抗人IgG二级试剂检测结合。使用对照aLYPD3 pAb和aTF mAb证实了LYPD3和TFa的表达。为了确定背景染色,包括了不相关的hIgG1对照。DAPI用于区分活细胞和死细胞。使用Canto II (BD) 流式细胞仪分析细胞。

[0379] 所有测试的aLYPD3克隆均与表达高水平的LYPD3和TFa的细胞系Caov-3结合。结合

与aLYPD3 pAb相当(图11A)。与Caov-3相比,ZR-75-1细胞系表达较低水平的TFa,并且因此在唾液酸酶处理之前和之后(以暴露其它TFa分子)研究了aLYPD3克隆与ZR-75-1的结合。所有aLYPD3克隆均与唾液酸酶处理的ZR-75-1结合(图11B)。一些aLYPD3克隆(16F9、19G10、25A6和26A4)显示也与未处理的ZR-75-1结合。aLYPD3克隆不与MDA-MB-231细胞结合,所述MDA-MB-231细胞在唾液酸酶处理后显示高水平的TFa但不表达LYPD3(图11C)。

[0380] 实施例8:使用蛋白G-药物缀合的aLYPD3抗体抑制增殖

[0381] 为了研究aLYPD3克隆将细胞毒性药物递送到靶细胞中的潜力,进行了蛋白G-药物缀合物测定。在平底96孔板中,在存在指定的测试抗体稀释液以及恒定浓度的预载有毒素MMAE的蛋白G(Protein G-MMAE, Levena Biopharma)的情况下,每孔接种5000个LYPD3-F9细胞。孵育4天后,根据制造商的说明,使用CellTiter-Glo®发光细胞活力测定法(Promega)评估细胞活力,并在微量板读取仪TECAN Infinite F200(Tecan)中进行分析。基于发光信号计算相对于不含抗体的培养基对照的增殖百分比。

[0382] 结果证明,与蛋白G-MMAE缀合的aLYPD3克隆17B3以剂量依赖性方式抑制LYPD3-F9的增殖,表明aLYPD3克隆的有效内化(图12)

[0383] 实施例9:糖特异性抗LYPD3抗体的组织结合

[0384] 福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片用10μg/ml aLYPD3克隆染色,并使用与抗小鼠或抗人二抗缀合的HRP标记的聚合物进行检测。包括了商业多克隆aLYPD3抗体以检测各个组织中LYPD3的蛋白质水平。

[0385] 癌组织切片的染色显示aLYPD3克隆与不同来源的头颈部鳞状细胞癌、食管癌、乳腺癌、宫颈癌和皮肤癌结合。重要的是,在图13和表2中显示,与蛋白质特异性对照aLYPD3 pAb相比,对健康组织的反应性不存在或降低。总之,发现aLYPD3克隆与几种癌症组织切片发生反应,但与健康的对应物不发生反应。特别地,17B3和21E9克隆显示与肛门区域/直肠、口腔、唇部、颊腔、鼻、阴茎、外阴、会厌、舌和皮肤的SCC癌症组织切片强烈相互作用(数据未显示)。

[0386] 表2-aLYPD3克隆与健康组织的结合

	食管	宫颈	扁桃体
aLYPD3 pAb	+	+	+
16F9	+/-	+/-	-
[0387] 17B3	-	-	-
19B4	-	-	-
19G10	-	-	-
22A11	-	-	-
[0388] 26A4	-	-	-

[0389] 显示了与pAb对照抗体相比aLYPD3克隆与健康组织的结合,根据染色强度分类:++中等至强染色,+/-弱染色,-未观察到染色。

[0390] 特别地,17B3和21E9克隆显示与肛门区域/直肠、口腔、唇部、颊腔、鼻、阴茎、外阴、会厌、舌和皮肤的SCC组织切片强烈相互作用。

[0391] 实施例10:抗huLYPD3抗体21E9的兔重链和轻链可变区的人源化

[0392] 将编码单克隆抗huLYPD3抗体21E9的兔重链和轻链可变区(SEQ ID NO:39和40)的核酸序列分别连接到人恒定 γ 1区(CH)和人恒定 κ 区(CL)的序列。

[0393] 在这些嵌合克隆的基础上,构建了人源化抗体。为此,将点突变引入VH和VL的兔构架区的核酸序列中,以产生相应的人构架区。目标人构架区是从NCBI GenBank条目生成的数据库中选择(经过清理以去除不完整和非人类序列),以包括种系和成熟抗体构架。特别地,取决于它们的整体序列相似性和它们的CDR环分类,从文库中选择最相关的构架区。所有获得的数据都被考虑以设计亲本兔抗体的人源化可变轻链和可变重链的一组不同的可变序列。一些变体在关键位置包含兔序列的回复突变。将轻链可变区的八个人源化变体克隆到 κ 链载体中,并将重链可变区的八个人源化变体克隆到 γ 1链载体中。

[0394] 瞬时地表达包含获得的重链和轻链的不同组合(总共64种抗体变体)的抗体,并根据实施例3在ELISA中筛选其表达和LYPD3结合。选择以下人源化抗体重链和轻链可变区以进行进一步分析。

[0395] 表3-人源化抗体重链和轻链可变区

[0396]

VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
1	138	1	143
2	139	2	144
3	140	4	145
6	141	8	146
7	142		

[0397] 9种选择的人源化VH和VL序列的抗体组合通过在CHO细胞中瞬时表达作为人IgG1/ κ 产生,并通过蛋白A色谱法纯化。

[0398] 表4-测试的人源化抗体

[0399]

抗体生产批号	VH	VL
21E9-219	2	2
21E9-220	3	2
21E9-221	6	2
21E9-222	7	2
21E9-224	7	1
21E9-225	7	4
21E9-226	7	8
21E9-227	1	4
21E9-228	3	4

[0400] 根据实施例3和4,在ELISA和流式细胞术测定中分析它们的结合特异性和亲和力,并与亲本嵌合抗体进行比较。数据汇总在图14、15和16中。所有人源化抗体变体对携带TF或Tn的LYPD3显示出与亲本抗体21E9相同的结合亲和力和特异性。

[0401] 序列表

[0402]

SEQ ID NO	描述	序列
抗体 16F9		
1	CDR-H1	GFSFSSHP
2	CDR-H2	ISGAGSHT
3	CDR-H3	AKGASSGSDSDRWTYDGGIDE
4	CDR-L1	SY Y
5	CDR-L2	Y N
6	CDR-L3	GNADSSGTII
7	VH 氨基酸	AVTLDES GGGLQTPGGALSLVCKASGFSFSSHPMMWVRQAP GKGLEFVATISGAGSHTYYGSAVKGRITISRDNGQSTVRLQL NNLRAEDTATYYCAKGASSGSDSDRWTYDGGIDEWGHGTEV IVS
8	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANPGETIKITCSGGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVI YYNDNRPSNIPSRFSGSASGSTHTLTITGVQADDEAVYYCGNA DSSGTIIFGAGTTLTV
抗体 17B3		
9	CDR-H1	GIDLSSNA
10	CDR-H2	MSISGNP

[0403]

SEQ ID NO	描述	序列
11	CDR-H3	AKSIHCTWWYCANVL
12	CDR-L1	QSISSY
13	CDR-L2	SA
14	CDR-L3	QGYDSISGVNYYNF
15	VH 氨基酸	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSNAISWVRQAPGKG LEYIGTMSISGNPNYASWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSPTTED TATYFCAKSIHCTWWYCANVLWGQGTLLTVS
16	VL 氨基酸	ALVMTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQSISSYLAWYQQKLGQ PPKLLIYSASILASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAATY YCQGYDSISGVNYYNFFGGGKVVV
抗体 19B4		
17	CDR-H1	GFDFSSHG
18	CDR-H2	ISNTGSFT
19	CDR-H3	ARSSSAGGAADSIDA
20	CDR-L1	GNSYGIYY
21	CDR-L2	SN
22	CDR-L3	GSLDNSSAGI
23	VH 氨基酸	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFSSHGMFWVRQAP GKGLLEYVAEISNTGSFTAYGAAVKGRATISRDDGQSTVRLQL NNLRAEDTGTYCARSSSAGGAADSIDAWGHGTEVIVS
24	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGNSYGIYYYYGWCQQKSPGS APVTVIYSNDKRPSNIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQVEDEAVY YCGSLDNSSAGIFGAGTTLTV
抗体 19G10		
25	CDR-H1	GFTFNND
26	CDR-H2	IGNDGSWT
27	CDR-H3	AKSAGGGGLISYTADYIDA
28	CDR-L1	GN
29	CDR-L2	QN
30	CDR-L3	GSEDKTTGYAA
31	VH 氨基酸	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFNNDMGWVRQAP GKGLEFVAGIGNDGSWTGYGSAVKGRATISRDNQSTVRLQL NNLRAEDTGTYFCAKSAGGGGLISYTADYIDAWGHGTEVIVS
32	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGNYGWYQQKSPGSAPVTLI YQNTNRPSNIPSRFSGSKSGSTATLTITGVQADDEAVYYCGSE DKTTGYAAFGAGTTLTV
抗体 21E9		
33	CDR-H1	GFDFSNNYY
34	CDR-H2	IAAGSGGYT
35	CDR-H3	ASSGDYKGFNL

[0404]

SEQ ID NO	描述	序列
36	CDR-L1	QSISSY
37	CDR-L2	GA
38	CDR-L3	QGYYYSFSDIFA
39	VH 氨基酸	QSVEESGGGLVKPGGTLTLTCTASGFDFSNNYYMCWVRQAP GKGLEWIAICIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISNTSSTTVTLQM TSLTAADTATWFCASSGDYKGFNLWGPGLTVTS
40	VL 氨基酸	ALVMTQTPASVEAAVGGTVTINCQASQSISSYLAWYQQKRG QPPKLLIYGASNLASGVPSRFKSGSGSGTEYTLTISGVQCADAA TYYCQGYYYSFSDIFAFGGGTEVVV
抗体 22A11		
41	CDR-H1	GFTFSDYS
42	CDR-H2	IHCTGSYT
43	CDR-H3	AKSAASGSCTSRSYIYTADTIDA
44	CDR-L1	SSY
45	CDR-L2	YN
46	CDR-L3	GAYDGNTDAGI
47	VH 氨基酸	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDYSMQWVRQAP GKGLEWVAGIHCTGSYTYGPAVKGRVTISRDNQSTVRLQL NNLRAEDTGTYCAKSAASGSCTSRSYIYTADTIDAWGHGTE VIVS
48	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGSSSYGWYQQKSPGSVPVTLI YYNNKRPSDIPSRFSGSTSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCGAY DGNTDAGIFGAGTTLTV
抗体 25A6		
49	CDR-H1	GFTFSSYD
50	CDR-H2	INADGSNT
51	CDR-H3	ARSFGTGGYYHIAIGPGFIDA
52	CDR-L1	SNSG
53	CDR-L2	WN
54	CDR-L3	GNEDSSDPTGAI
55	VH 氨基酸	AVTLDESGGGLQTPGGALSLICKSGGFTFSSYDMGWMRQAPG KGLEFVAGINADGSNTGYGPAVKGRATISRDNQSTVRLQLN NLRAEDTATYYCARSGTGGYYHIAIGPGFIDAWGHGTEVIVS
56	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGDSNSGYGWYQQKSPGSALVT VIYWNDKRPSNIPSRFSGSTSGSTNTLTITGVQADDEAVYFCG NEDSSDPTGAIFGAGTTLTV
抗体 26A4		
57	CDR-H1	GFTFSDYG
58	CDR-H2	ISSADGSST
59	CDR-H3	AKAAYGSAWNYAIIIDA

[0405]

SEQ ID NO	描述	序列
60	CDR-L1	SDN
61	CDR-L2	NN
62	CDR-L3	GGYDSSTYAGI
63	VH 氨基酸	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSYGMGWTRQAP GKGLEYYVASISSADGSSTWYAPAVKGRATISRDNGQSTVRL QLNNLRAEDTATYYCAKAAYGSAWNYAIIIDAWGHGTEVIVS
64	VL 氨基酸	ALTQPSSVSANLGGTVEITCSGGSDNYGWFQKSPGSAPVTVI YNNNNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGGY DSSTYAGIFGAGTTLTV
抗体 YU912-B09		
65	CDR-H1	GFTFSNYA
66	CDR-H2	IRSGSGTT
67	CDR-H3	AKNKAYYDSSGYDY
68	CDR-L1	SSNIGVGYD
69	CDR-L2	GN
70	CDR-L3	QSYDSSLSGVV
71	VH 氨基酸	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAP GKGLEWVSAIRSGSGTTYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQM NSLSAEDTAVYYCAKNKAYYDSSGYDYWGQGTTVTVS
72	VL 氨基酸	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGVGYDVHWWYQLPG TAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYCYQSYDSSLSGVVFGGGTKLTV
抗体 YU912-G05		
73	CDR-H1	GYTFTSYG
74	CDR-H2	ISAYNGNT
75	CDR-H3	ARDGNWRGFDY
76	CDR-L1	SSNIGSNY
77	CDR-L2	RN
78	CDR-L3	AAWDDSLSGSWV
79	VH 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAP GQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDGNWRGFDYWGQGTLVTVS
80	VL 氨基酸	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYVYQQLPGT APKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGASASLAISGLRSEDEAD YYCAAWDDSLSGSWVFGGGTKVTV
抗体 YU912-B06		
81	CDR-H1	GFTFSSYG
82	CDR-H2	ISYDGSNK
83	CDR-H3	ANYYDSSGYLPEYFQH
84	CDR-L1	SSDVGGYNY

[0406]

SEQ ID NO	描述	序列
85	CDR-L2	DV
86	CDR-L3	SSYTSSSTYWV
87	VH 氨基酸	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANYDSSGYLPEYFQHWGQGTLTVS
88	VL 氨基酸	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYWVFGGGTKVTV
抗体 YU913-B01		
89	CDR-H1	GFTFSSYG
90	CDR-H2	IWYDGSNK
91	CDR-H3	ATQHQVTDGEPFDY
92	CDR-L1	SSNIGSNY
93	CDR-L2	RN
94	CDR-L3	AAWDDSLSGPV
95	VH 氨基酸	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQHQVTDGEPFDYWGQGTLTVS
96	VL 氨基酸	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKLTV
抗体 YU912-D06		
97	CDR-H1	GFTFSSYS
98	CDR-H2	ISSSSSYI
99	CDR-H3	ANWSYGYRAFDY
100	CDR-L1	SSDVGGYNY
101	CDR-L2	DV
102	CDR-L3	SSYTSSSTYVV
103	VH 氨基酸	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCANWSYGYRAFDYWGQGTLTVS
104	VL 氨基酸	QSAPTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGGGTKVTV
抗体 YU912-A03		
105	CDR-H1	GFTFSSYS
106	CDR-H2	ISSSSSYI
107	CDR-H3	ASSIAVAGIMGY
108	CDR-L1	QSVSSN
109	CDR-L2	GA

[0407]

SEQ ID NO	描述	序列
110	CDR-L3	QQYNNWPT
111	VH 氨基酸	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSIAVAGIMGYWGQGTLVTVS
112	VL 氨基酸	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPTFGQGTKLEI
抗体 YU912-C07		
113	CDR-H1	GGTFSSYT
114	CDR-H2	IIPILGIA
115	CDR-H3	ATDVEMATRV DY
116	CDR-L1	SSNIGSNY
117	CDR-L2	RN
118	CDR-L3	AAWDDSLSGAV
119	VH 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYTISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCATDVEMATRV DYWGQGTLVTVS
120	VL 氨基酸	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIPCSGSSSNIGSNYVYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGAVFGGGTKLTV
抗体 YU912-G08		
121	CDR-H1	GYSFTSYW
122	CDR-H2	IYPGDSDT
123	CDR-H3	ARGDYSSGWYY
124	CDR-L1	SPNVGTNY
125	CDR-L2	GN
126	CDR-L3	ETWDNSLNAYV
127	VH 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDYSSGWYYWGQGTLVTVS
128	VL 氨基酸	QSVLTQPPSVSAAAGQKVTISCSGSSPNVGTNYVSWYQQLPGTAPKLLILGNDRRPSAIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDNSLNAYVFGGTGTQLTV
抗体 YU912-G07		
129	CDR-H1	GYTFSTSG
130	CDR-H2	INGYGSHR
131	CDR-H3	ARDHDWNGFDN
132	CDR-L1	SSNIGSNY
133	CDR-L2	RN
134	CDR-L3	AAWDDSLSGLWV

[0408]

SEQ ID NO	描述	序列
135	VH 氨基酸	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKASGYTFSTSGISWVRQAPGQGLEWMGWINGYGSHRLFPQNFQGRLLTDTSTSTAYMEVRSLSRDDTAIYYCARDHDWNGFDNWGQGLVTVS
136	VL 氨基酸	SYVLTQPPSASGTPGQRTVITSCGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLWVFGGGTKLTV
人 LYPD3		
137	hLYPD3	MDPARKAGAQAAMIWTAGWLLLLLLRGGAAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCAKLNLTSLRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPVVCYNASDHVYKGCDFGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYFSPRIPLVRLPPPEPTTVA STTSVTTSTSAVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGVHEASRDEEPLRTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAA LLLAVAAGVLL
抗体 21E9 的人源化版本		
138	VH_1 氨基酸	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFDSSNYYYMCWIRQAPGKGLEWVSCIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSGDYKGFNLWGQGLVTVS
139	VH_2 氨基酸	LVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFDSSNYYYMCWIRQAPGKGLEWVSCIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVWYCASSGDYKGFNLWGQGLVTVS
140	VH_3 氨基酸	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSNYYYMCWVRQAPGKGLEWVLCIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCASSGDYKGFNLWGQGLVTVS
141	VH_6 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSNYYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSGDYKGFNLWGQGMVTVS
142	VH_7 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSNYYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIAAGSGGYTTYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSGDYKGFNLWGQGLVTVS
143	VL_1 氨基酸	EIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYYSFSDIFAFGGGTKVEI
144	VL_2 氨基酸	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSYLAWYQQKPGKPKLLIYGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQGYYSFSDIFAFGGGTKVEI
145	VL_4 氨基酸	AIRIAQSPSSLSASTGDRVITTCQASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQSEDVATYYCQGYYSFSDIFAFGGGTKVEI
146	VL_8 氨基酸	EIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSYLAWYQQKPGKPKLLIYGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQGYYSFSDIFAFGGGTKLEI

[0409] 保藏的生物材料的鉴定

[0410] 细胞系DSMACC 2606由Nemod Biotherapeutics GmbH&Co.KG (Robert-Rössle-Str.10,13125Berlin(德国))于下表所示的日期保藏于德国微生物保藏中心(Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig (德国))。由于所述生物材料同时由 Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG 转让给 Glycotope GmbH, 因此 Glycotope 有权提及该生物材料。

[0411] 细胞系 DSMACC 2806、DSMACC 2807 和 DSMACC 2856 由 Glycotope GmbH (Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (德国)) 于下表所示的日期保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (德国))。

[0412]

细胞系的名称	登记号	保藏人	保藏日期
NM-F9	DSM ACC 2606	Nemod Biotherapeutic	2003 年 8 月 14 日
NM-H9D8	DSM ACC 2806	Glycotope GmbH	2006 年 9 月 15 日
NM-H9D8-E6	DSM ACC 2807	Glycotope GmbH	2006 年 10 月 5 日
NM-H9D8-E6Q12	DSM ACC 2856	Glycotope GmbH	2007 年 8 月 8 日

关于微生物保藏の説明

申请人或代理人档案号 IIC241471	国际申请号 PCT/EP2023/056832
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏の説明
(专利合作条约实施细则 13 之 2)

[0001]

微生物保藏の説明(1)	
A.对说明书第 70 页, 第 2 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明	
B. 保藏事項 更多的保藏在附加页説明 ☒	
保藏单位名称 德国微生物保藏中心-DSMZ	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2003-08-14	保藏号 DSM ACC 2606
C.补充説明 (必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
无	
D.本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的)	
E.补充説明 (必要时)	
下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”) 无	

由受理局填写	由国际局填写
本页已经和国际申请一起收到	国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

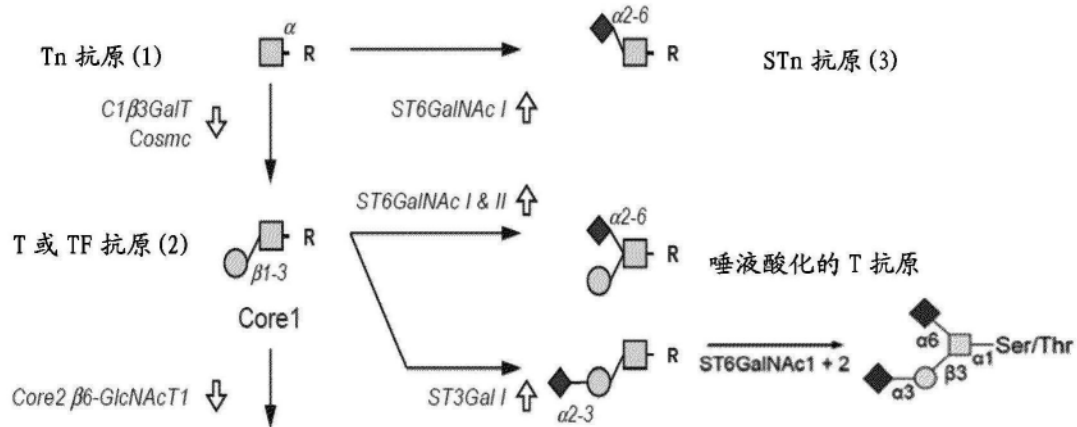


图1

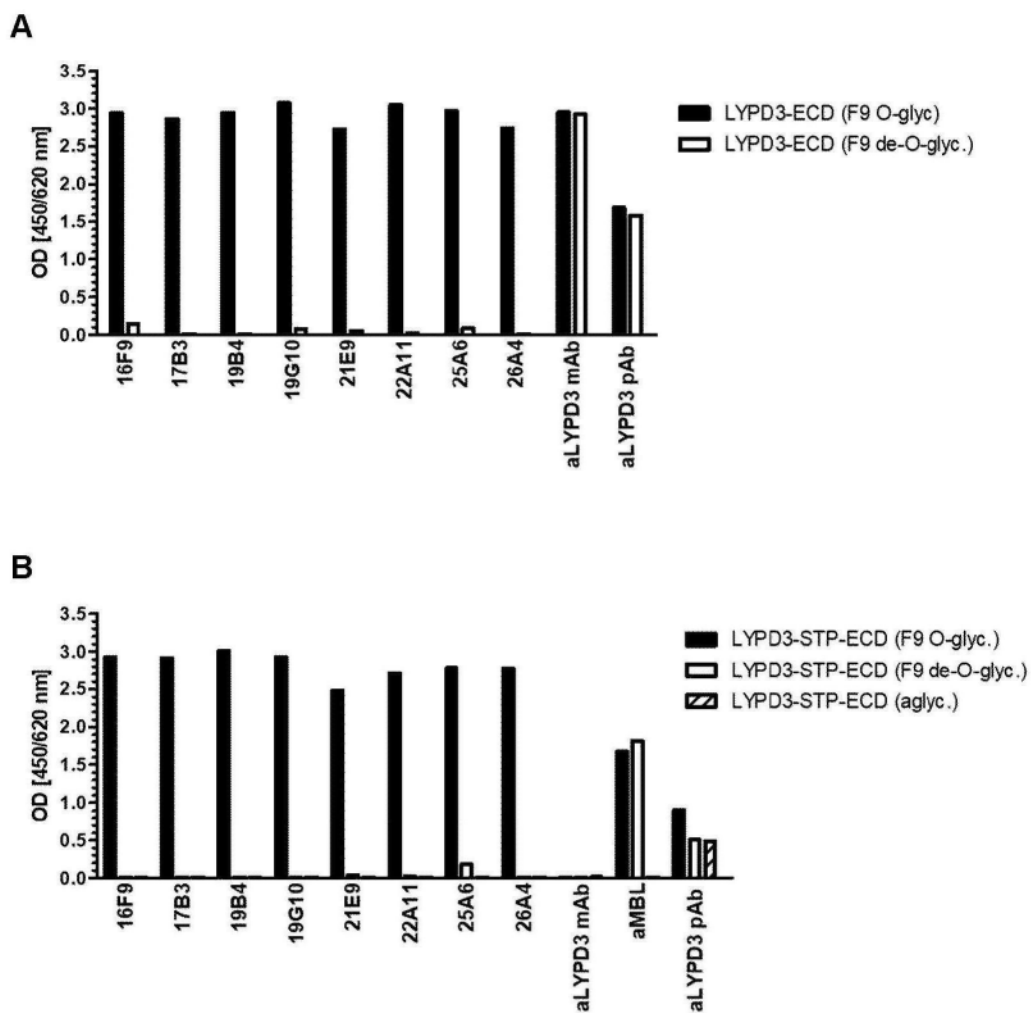


图2

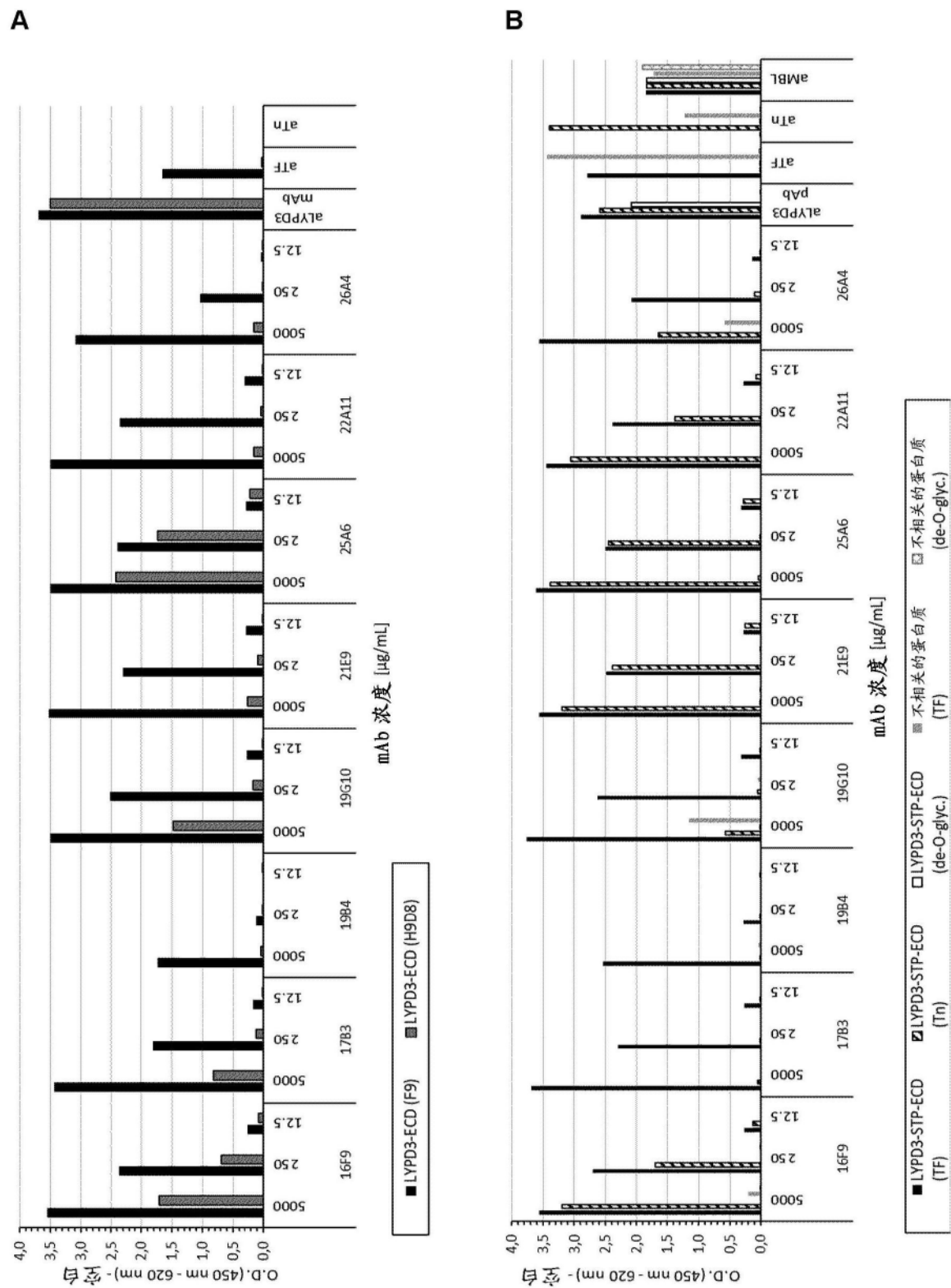


图3

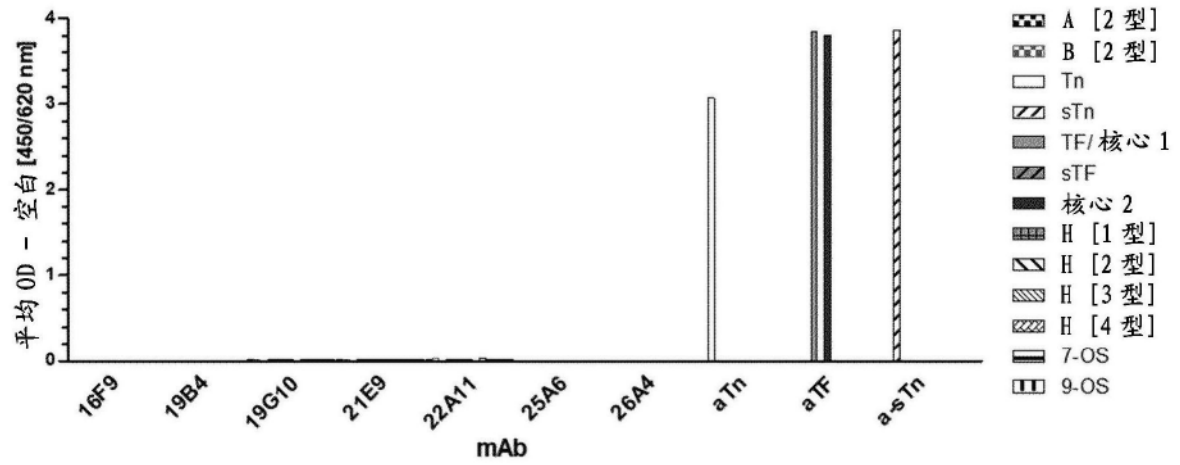


图4

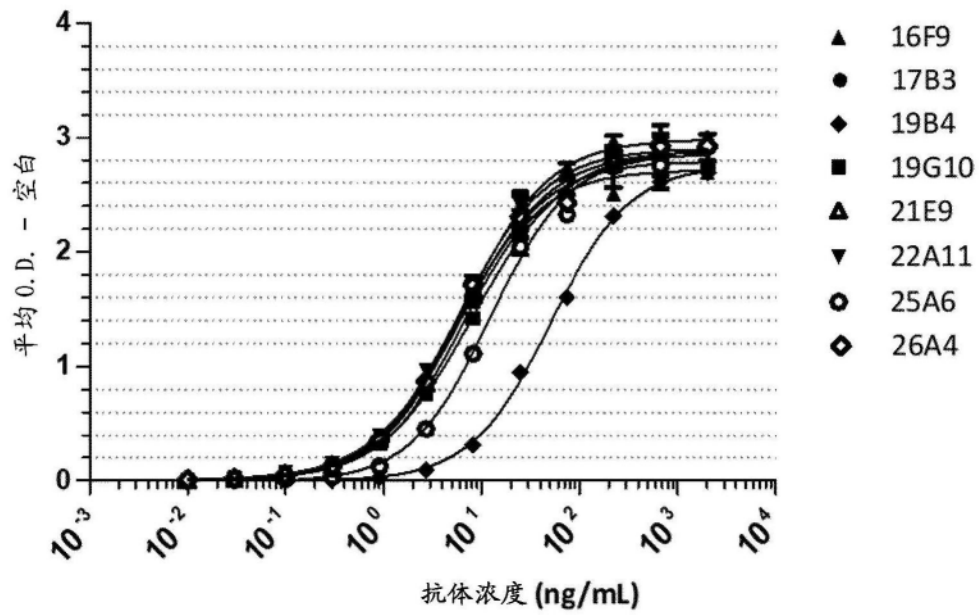


图5

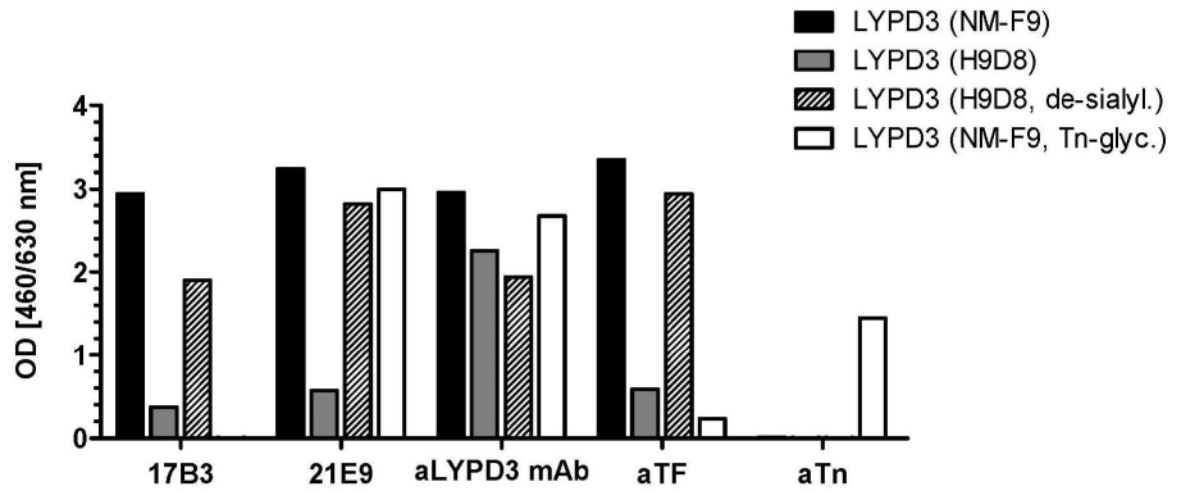


图6

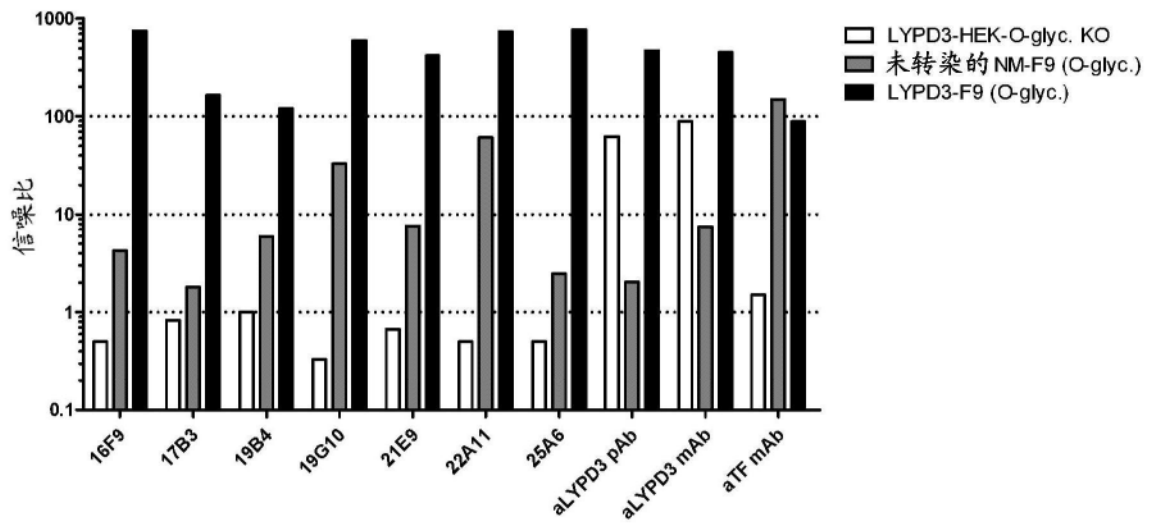


图7

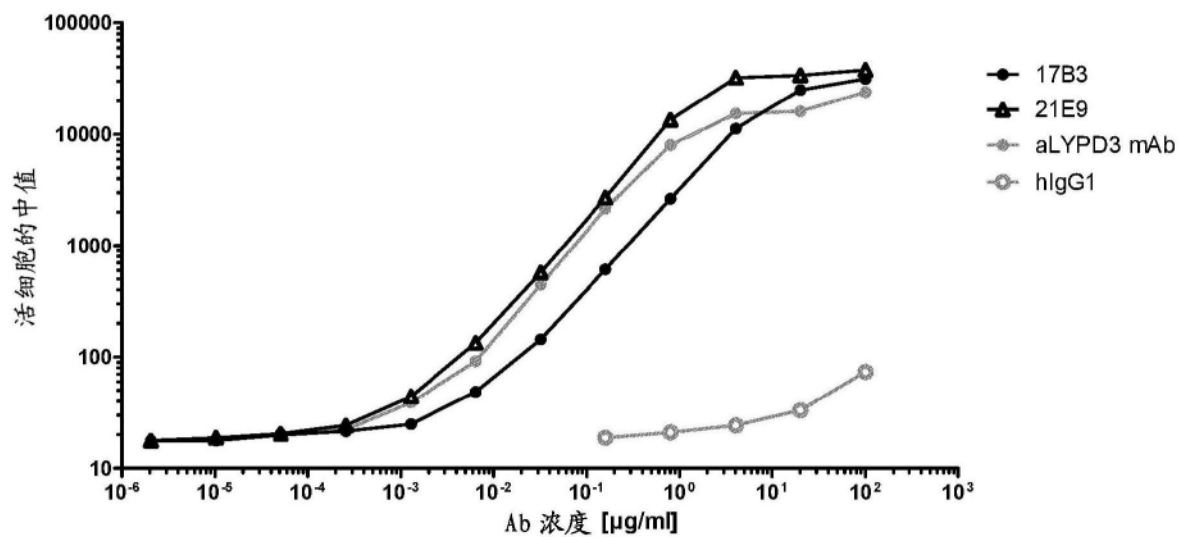


图8

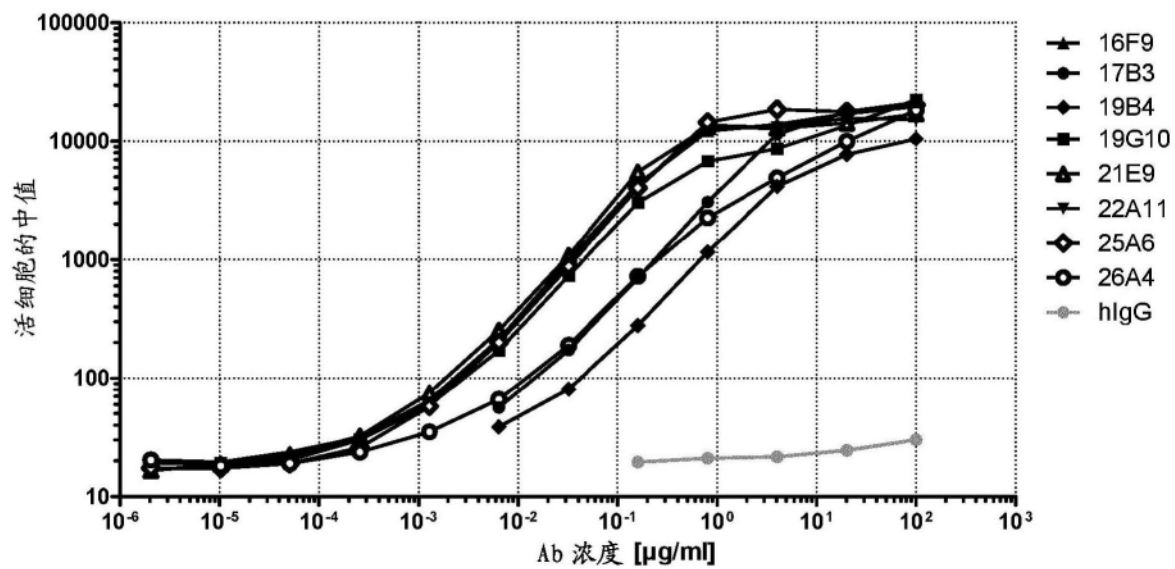


图9

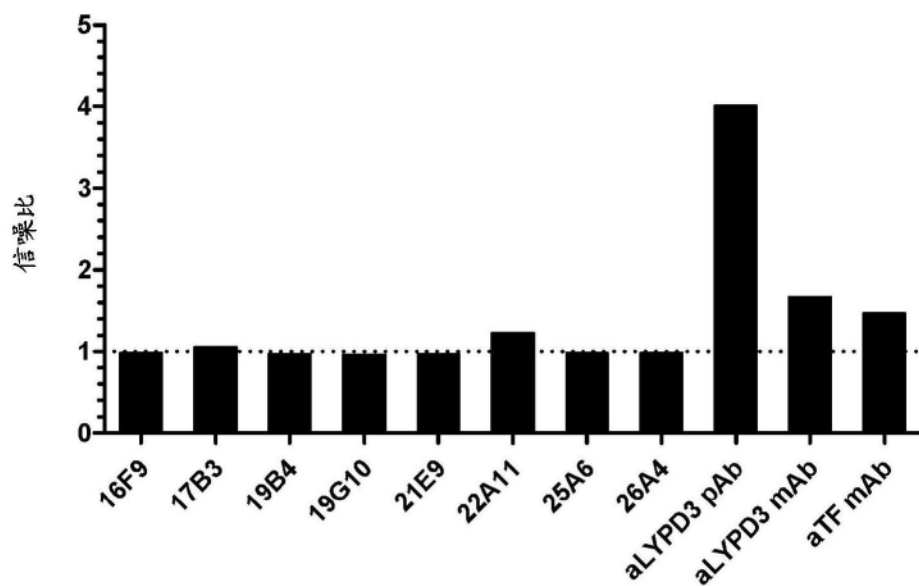


图10

A

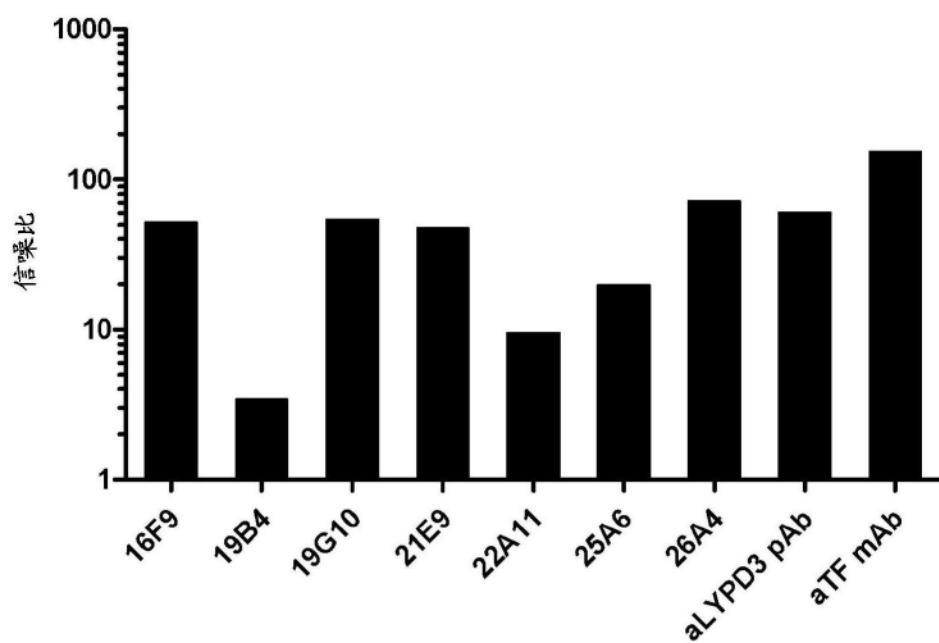


图11

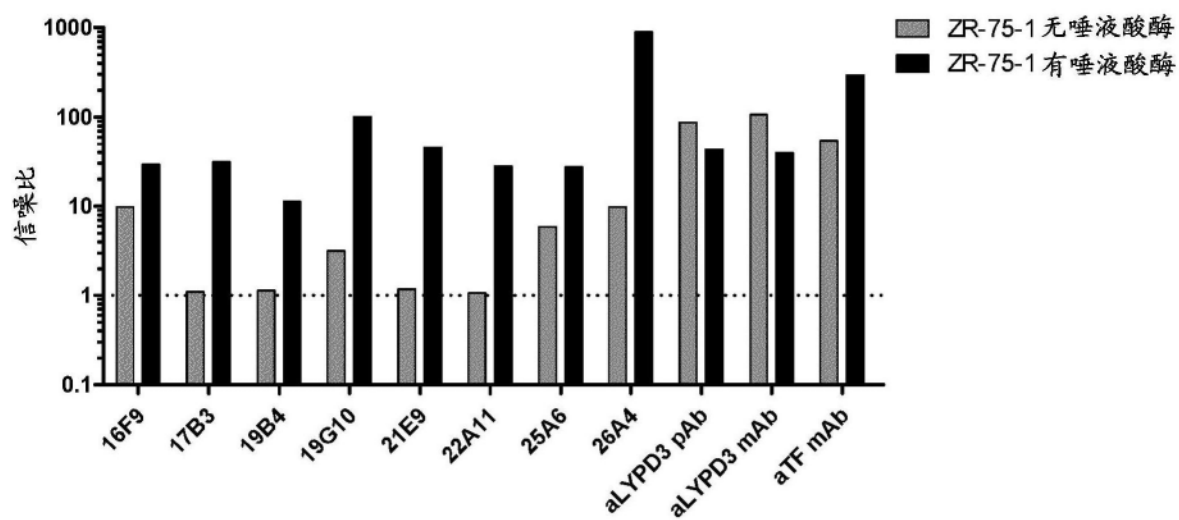
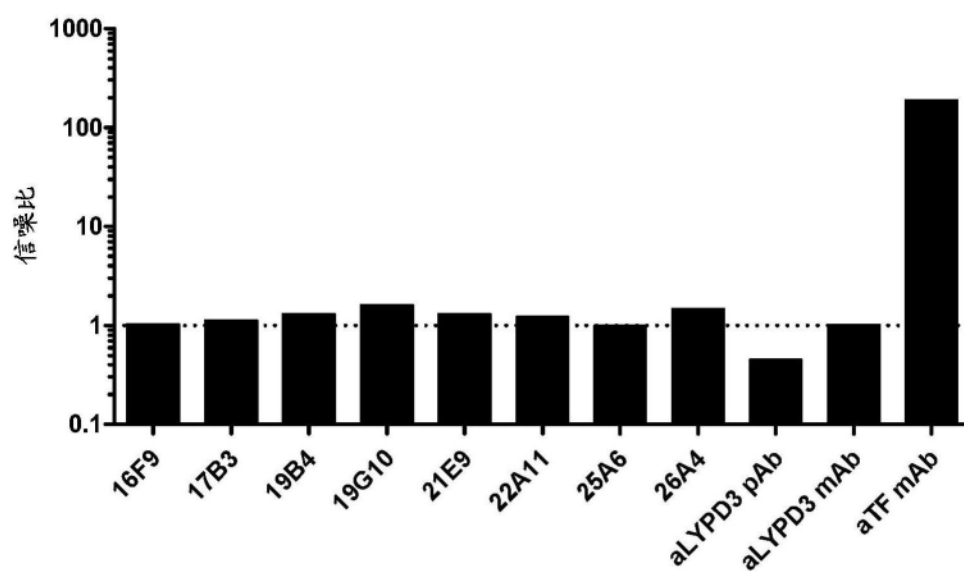
B**C**

图11(续)

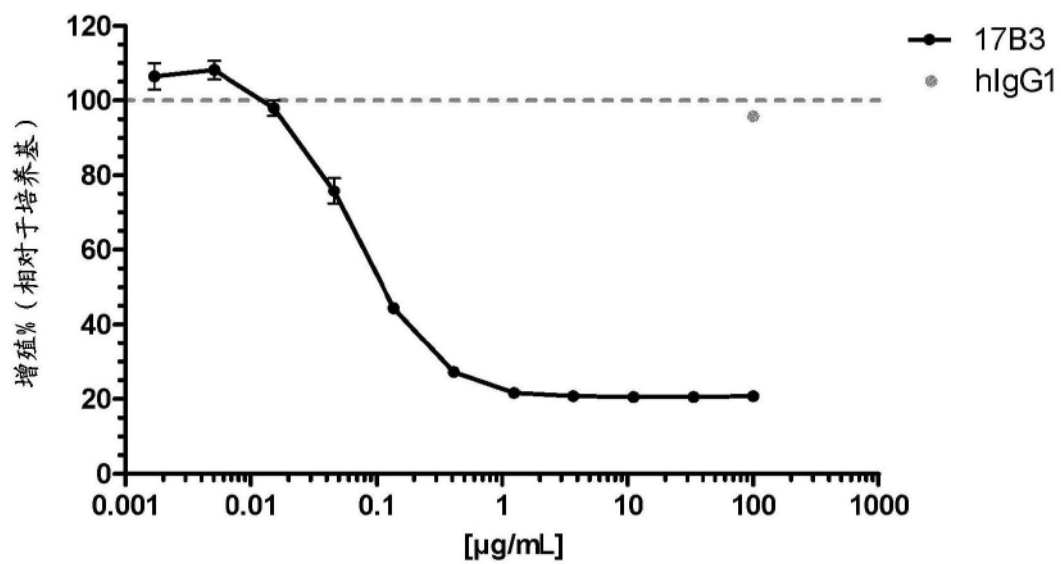


图12

aLYPD3 pAb

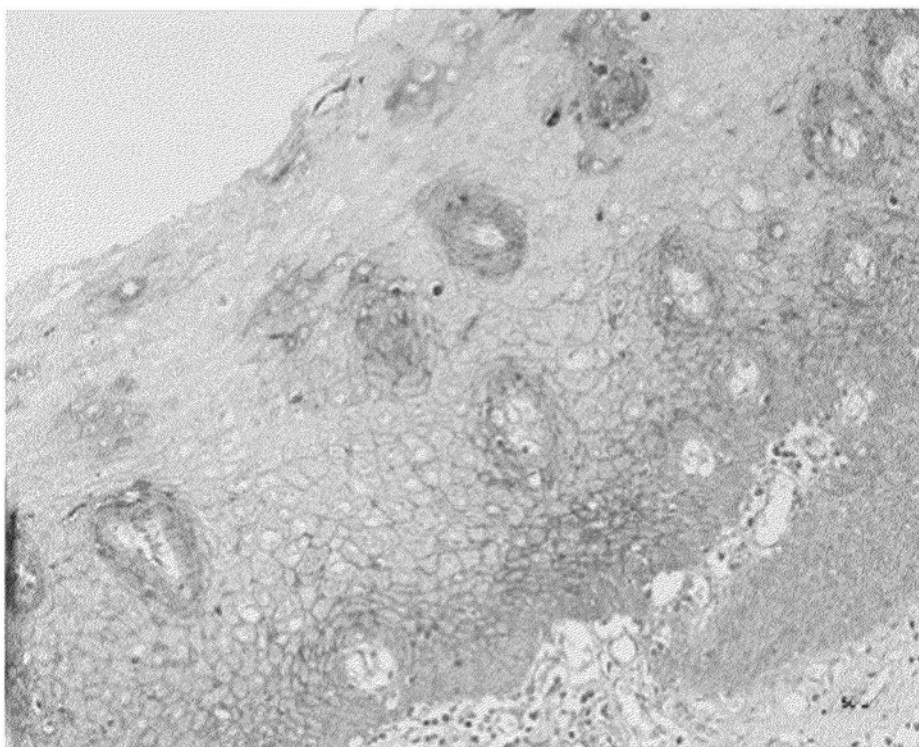
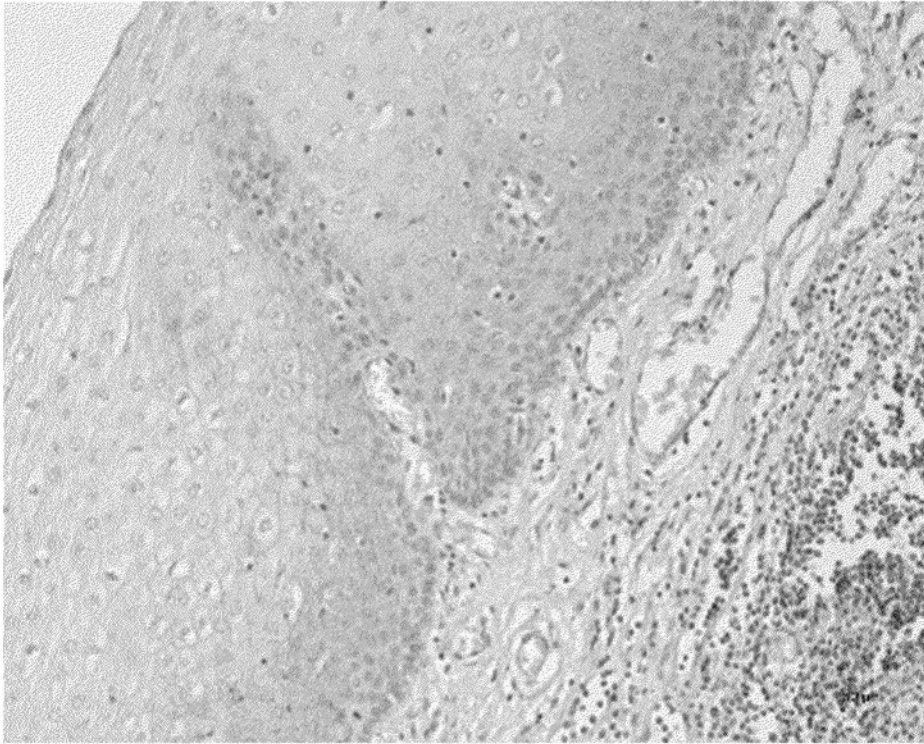


图13

16F9



17B3

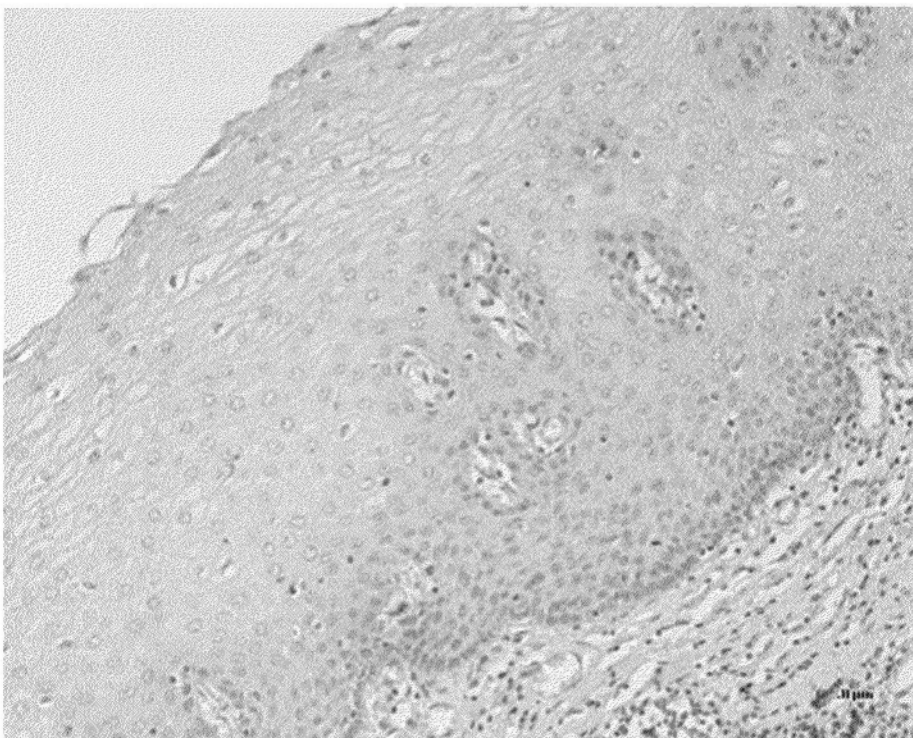


图13(续)

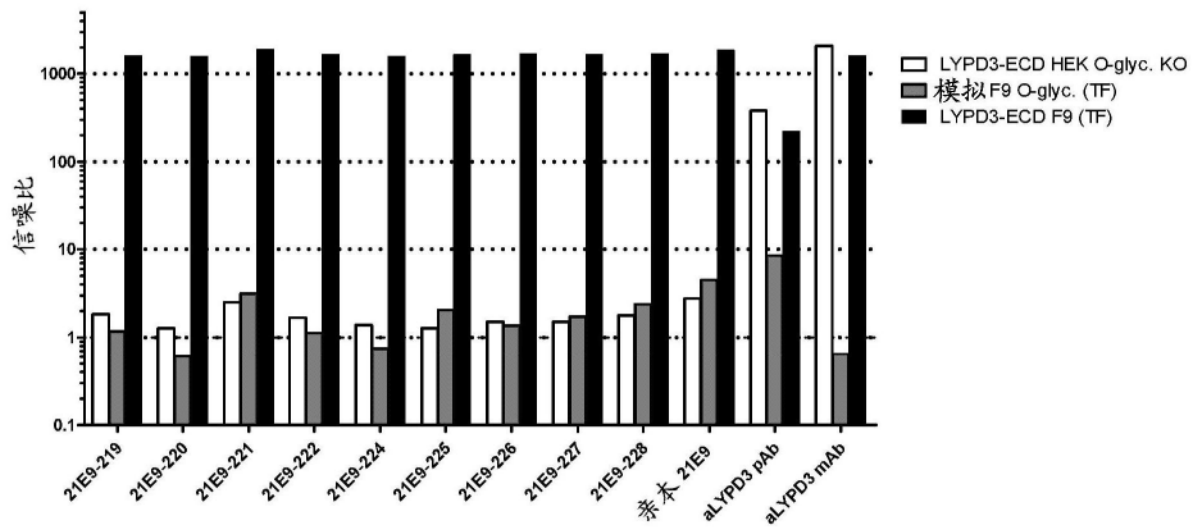
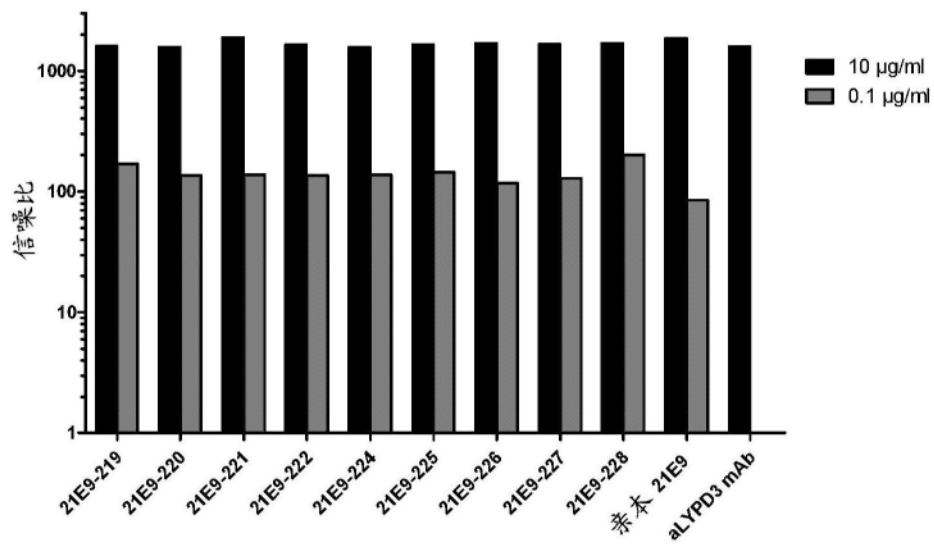
A**B**

图14

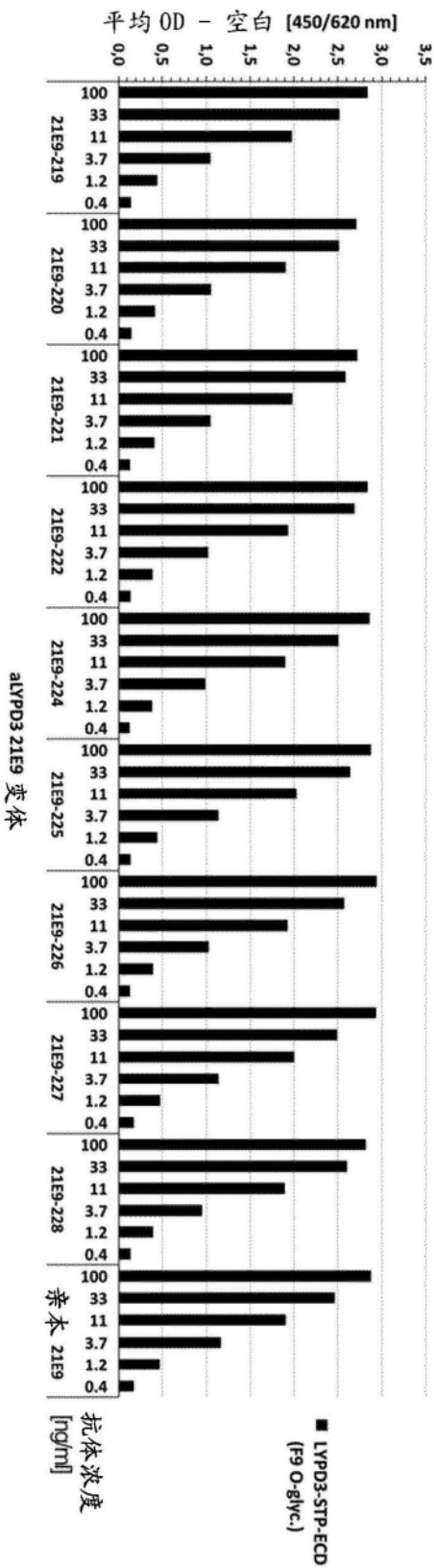


图15

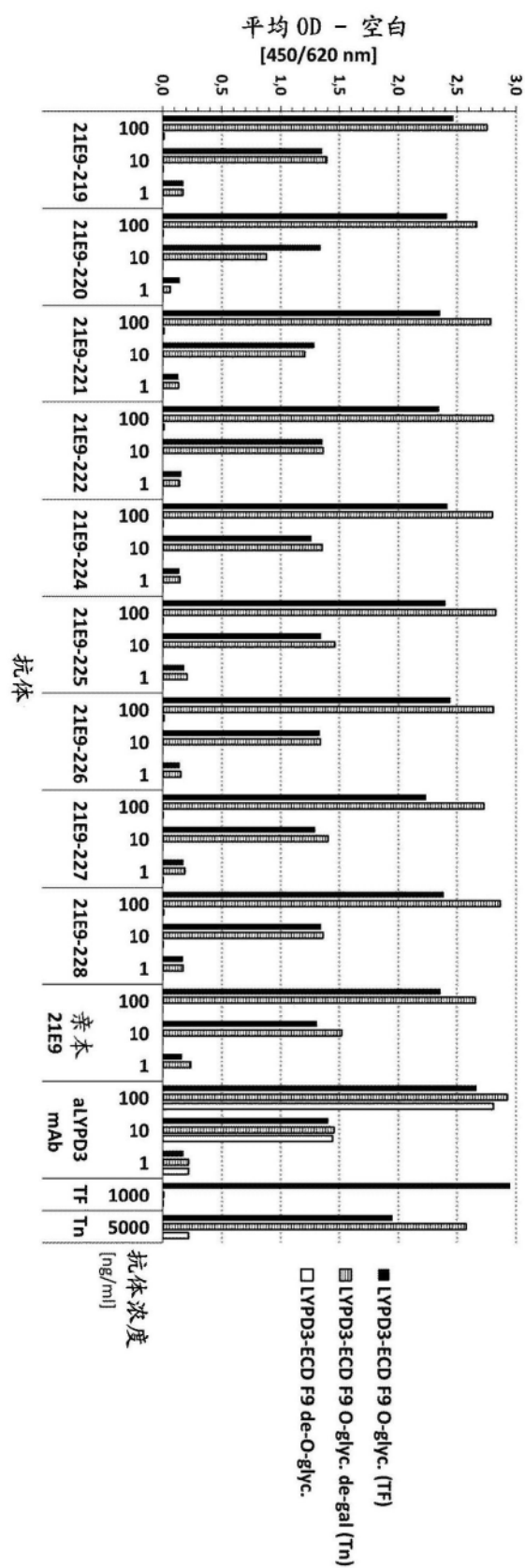


图16